

**Welche Hydroxycinnamoyltransferasen sind in
Coleus blumei und in *Glechoma hederacea*
nachweisbar und worin besteht der Einfluss
von Ozon auf *Melissa officinalis*?**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

**Anne Sarah Döring
aus Schleiz**

Marburg/Lahn 2013

Prodekan: Prof. Dr. Carsten Culmsee

1. Gutachter: Prof. Dr. Maike Petersen

2. Gutachter: Prof. Dr. Klaus Reuter

Eingereicht am: 08.11.2013

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2013

Hochschulkennziffer: 1180

The most certain way to succeed is always to try just one more time.

(Thomas A. Edison)

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| 1-qP | Reduktionsstatus von Plastochinon Q _A |
| 4CL | Hydroxyzimtsäure:Coenzym A-Ligase |
| A | Netto-CO ₂ -Assimilationsrate |
| ABA | abscisic acid (Abscisinsäure) |
| A _{max} | maximale Photosyntheseaktivität bei Lichtsättigung |
| Amp | Ampicillin |
| ANOVA | one-way analysis of variance |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| AS | Aminosäure |
| AsA | Ascorbat |
| A _{sat} | Photosyntheseaktivität bei Lichtsättigung |
| | Bisphosphat Carboxylase/Oxygenase |
| bp | base pairs (Basenpaare) |
| BP | Bindepuffer |
| BSA | Rinderserumalbumin (bovine serum albumin) |
| C4H | Zimtsäure 4-Hydroxylase |
| CAD | Cinnamylalkohol Dehydrogenase |
| CAFE | clean air for Europe |
| CAPS | 3-(Cyclohexylamino)-1-Propansulfonsäure |
| Cb | <i>Coleus blumei</i> |
| cDNA | complementary DNA (komplementäre DNA) |
| Chl a/b | Verhältnis von Chlorophyll a zu Chlorophyll b |
| Chl a+b | Summe von Chlorophyll a und Chlorophyll b |
| CHS | Chalconsynthase |
| C _i | interzelluläre CO ₂ -Konzentration |
| CoA | Coenzym A |
| CODEHOP | Consensus Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primer |
| CTAB | Cetyltrimethylammoniumbromid |
| CYP | Cytochrom P450 |
| d | Tage |
| DAB | 3,3'-Diaminobenzidin |
| DBPA-1 | Decorin-Binding Protein A (Dekorin-Bindeprotein A) |
| DCMU | 3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-Dimethylharnstoff |
| DEPS | Deepoxidationszustand |
| DHA | Dehydroascorbat |
| DHAR | Dehydroascorbat Reduktase |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DTT | Dithiothreitol |
| E | Evapotranspirationsrate |
| ε | Extinktionskoeffizient |

| | |
|--------------|--|
| EF1 α | Elongationsfaktor 1 α |
| ELISA | enzyme linked immunosorbent assay |
| EMK | Erlenmeyerkolben |
| EtBr | Ethidiumbromid |
| EtOH | Ethanol |
| F'_0 | minimale Fluoreszenz (im lichtadaptierten Zustand) |
| F'_{\max} | maximale Fluoreszenz (im lichtadaptierten Zustand) |
| F_0 | minimale Fluoreszenz (im dunkeladaptierten Zustand) |
| FBE | from beginning of exposure (nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode) |
| F_{\max} | maximale Fluoreszenz (im dunkeladaptierten Zustand) |
| F_s | steady-state Menge der Fluoreszenz (im lichtadaptierten Zustand) |
| F_v/F_m | Verhältnis von variabler zu maximaler Fluoreszenz |
| gDNA | genomische DNA |
| Gh | <i>Glechoma hederacea</i> |
| GPC | Gelpermeationschromatographie |
| GPRT | gene-specific primer for reverse transcription |
| GSP | gene-specific primer (Gen-spezifischer Primer) |
| G_w | stomatäre Leitfähigkeit für Wasserdampf |
| HCSQT | Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat/Chinat Hydroxycinnamoyltransferase |
| HOAc | Essigsäure |
| HPLC | high performance liquid chromatography (Hochdruckflüssigkeitschromatographie) |
| HPPR | Hydroxyphenylpyruvat Reduktase |
| HQT | Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinat Hydroxycinnamoyltransferase |
| hsd | host specificity for DNA |
| HST | Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat Hydroxycinnamoyltransferase |
| IPTG | Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid |
| ITE | instantaneous transpiration efficiency (unverzögerte Transpirationseffizienz) |
| J_{\max} | maximale Elektronentransportrate zur Regeneration von Ribulose-1,5-bisphosphat |
| LB | lysogeny broth |
| LHC | light-harvesting pigment-protein complex (Lichtsammelkomplex) |
| MDA | Malondialdehyd |
| MeOH | Methanol |
| mRNA | messenger RNA |
| MT | Methyltransferase |

| | |
|-------------------|---|
| OD ₆₀₀ | optische Dichte bei 600 nm |
| p.a. | pro analysi |
| PAL | Phenylalanin Ammoniak-Lyase |
| PAR | photosynthetically active radiation (photosynthetisch aktive Strahlung) |
| PCR | polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion) |
| PFD | photon flux density (Photonenflussdichte) |
| pHPL | 4-Hydroxyphenyllaktat |
| PLP | Pyridoxalphosphat |
| PPFD | photosynthetic photon flux density (photosynthetische Photonenflussdichte) |
| PSI | Photosystem I |
| PSII | Photosystem II |
| qP | photochemisches Quenching |
| RA | rosmarinic acid (Rosmarinsäure) |
| RACE-PCR | rapid amplification of cDNA-ends with polymerase chain reaction (Verlängerung der cDNA-Enden über PCR) |
| RAS | rosmarinic acid synthase (Rosmarinsäuresynthase) |
| R _d | Tagesrespirationsrate |
| RE | Restriktionsenzym |
| RH | relative humidity (relative Feuchte) |
| RuBisCO | Ribulose-1,5-Bisphosphat Carboxylase/Oxygenase |
| RuBP | Ribulose 1,5-Bisphosphat |
| SDS-PAGE | sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese) |
| SKDH | Shikimat Dehydrogenase |
| SS | Salicylsäure |
| TAT | Tyrosin Aminotransferase |
| TBA | thiobarbituric acid (Thiobarbitursäure) |
| TBE | Tris-Borat-EDTA |
| TBS | tris-buffered saline (Tris-gepufferte Salzlösung) |
| TCA | trichloroacetic acid (Trichloressigsäure) |
| TE | Tris-EDTA |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethyldiamin |
| TPU | triose phosphate utilization (Triosephosphatverwertung) |
| ÜN | über Nacht |
| UpM | Umdrehungen pro Minute |
| V _{cmax} | maximale Carboxylierungsrate der Ribulose-1,5- |
| X-Gal | 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl-β-D-Galactopyranosid |
| Φ _a | apparent quantum yield (apparente Quantenausbeute) |
| Φ _{CO2} | quantum efficiency (Quanteneffizienz) |
| Φ _{PSII} | actual quantum yield (tatsächliche Quantenausbeute) |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 <i>Coleus blumei</i> | 1 |
| 1.2 <i>Glechoma hederacea</i> | 2 |
| 1.3 <i>Melissa officinalis</i> | 3 |
| 1.4 Chlorogensäure, Kaffeesäure und Rosmarinsäure | 4 |
| 1.4.1 Rosmarinsäure | 4 |
| 1.4.1.1 Vorkommen | 4 |
| 1.4.1.2 Biosynthese | 5 |
| 1.4.2 Chlorogensäure | 9 |
| 1.4.2.1 Vorkommen | 9 |
| 1.4.2.2 Biosynthese | 10 |
| 1.4.3 Kaffeesäure | 11 |
| 1.4.3.1 Vorkommen | 11 |
| 1.4.3.2 Biosynthese | 11 |
| 1.5 BAHD-Acyltransferasen | 12 |
| 1.6 Auswirkungen von Ozon auf Pflanzen | 13 |
| 1.6.1 Vorkommen von Ozon | 13 |
| 1.6.2 Auswirkungen von Ozon auf die Photosynthese | 15 |
| 1.6.2.1. Beeinflussung des Xanthophyllzyklus | 17 |
| 1.6.3 Auswirkungen von Ozon auf den Sekundärstoffwechsel | 18 |
| 1.6.4 Antioxidative Mechanismen in Pflanzen | 20 |
| 1.7 Zielsetzung | 24 |
| 2. Material und Methoden | 25 |
| 2.1 Versuche zur Gewinnung von Proteinkristallen der RAS aus <i>Coleus blumei</i> | 25 |
| 2.1.1 <i>E. coli</i> -Wirtsstämme | 25 |
| 2.1.2 pET-Vektoren | 25 |
| 2.1.3 Expression des CbRAS-Proteins in <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS | 26 |
| 2.1.4 Präparation von Plasmid-DNA (Minipräparation) | 27 |
| 2.1.5 Restriktionsverdau der isolierten Plasmid-DNA | 28 |
| 2.1.6 Agarosegelelektrophorese | 29 |
| 2.1.7 Anlegen einer Bakteriendauerkultur | 30 |
| 2.1.8 Aufreinigung/Isolierung des CbRAS-Proteins aus inclusion bodies | 31 |
| 2.1.9 Variationsmöglichkeiten zur Isolierung des CbRAS-Proteins aus inclusion bodies | 33 |
| 2.1.10 Reinigung des CbRAS-Proteins über His-tag-Affinitätschromatographie | 35 |
| 2.1.11 Umpuffern durch PD-10 Säulchen | 35 |
| 2.1.12 Proteingehaltsbestimmung nach Bradford (1976) | 36 |
| 2.1.13 Synthese der CoA-aktivierten Säure Caffeoyl-CoA (Caf-CoA) | 37 |
| 2.1.14 Standardenzymtest zur Bestimmung der RAS-Aktivität | 38 |
| 2.1.15 HPLC-Analyse | 39 |
| 2.1.16 Aufkonzentrierung/Umpuffern mit Vivaspin 20 Zentrifugalkonzentratoren | 39 |
| 2.1.17 SDS-PAGE | 39 |
| 2.1.18 PAGE unter nativen Bedingungen | 41 |

| | |
|---|-----------|
| 2.1.19 Transformation von SoluBL21 TM Competent <i>E. coli</i> -Zellen | 42 |
| 2.1.20 Expression der CbRAS in SoluBL21 TM Competent <i>E. coli</i> -Zellen | 42 |
| 2.1.21 Optimierte Expressionsbedingungen in SoluBL21 TM Competent <i>E. coli</i> -Zellen | 43 |
| 2.1.21.1 Expression in 100 ml LB-Medium | 43 |
| 2.1.21.2 Bestimmung des Aktivitätsmaximums des CbRAS-Proteins | 44 |
| 2.1.21.3 Expression in 1000 ml LB-Medium | 44 |
| 2.1.22 Veränderung der Imidazol-Konzentration des His-tag-Waschpuffers | 44 |
| 2.1.23 Aufkonzentrierung durch TCA-Fällung | 44 |
| 2.1.24 Reinigung des Proteins über Gelpermeationschromatographie | 44 |
| 2.1.24.1 GPC Säule HiLoad TM 26/60 Superdex 200 | 44 |
| 2.1.24.2 GPC Säule HiLoad TM 26/60 Superdex 75 | 45 |
| 2.1.25 Kristallisationsversuche | 45 |
| 2.1.26 His-tag-Abspaltung | 47 |
| 2.2 Aktivitätstests von Chimären aus <i>Coleus blumei</i> | 49 |
| 2.3 Untersuchungen von <i>Glechoma hederacea</i>-Pflanzen | 50 |
| 2.3.1 RNA-Isolierung aus Blättern, Blüten, Stängeln und Wurzeln nach Chomczynski und Sacchi | 50 |
| 2.3.2 RNA-Isolierung aus Blättern, Blüten, Stängeln und Wurzeln nach Giuliano | 51 |
| 2.3.3 Synthese von cDNA | 52 |
| 2.3.4 Standard- und semiquantitative PCR | 53 |
| 2.3.4.1 Standard-PCR | 54 |
| 2.3.4.2 Semiquantitative PCR | 55 |
| 2.3.5 Untersuchung diverser „house-keeping“-Gene | 56 |
| 2.3.5.1 18S-ribosomale RNA (18S-rRNA) | 56 |
| 2.3.5.2 β -Aktin | 56 |
| 2.3.5.3 Elongationsfaktor 1 α (EF1 α) | 57 |
| 2.3.6 Expressionsstudien zu Hydroxycinnamoyltransferasen aus Blättern, Blüten, Stängeln und Wurzeln | 59 |
| 2.3.7 Extraktion von Chlorogen-, Kaffee- und Rosmarinsäure aus Blättern, Blüten, Stängeln und Wurzeln | 59 |
| 2.3.8 Versuche zur Isolierung einer Lamiaceae-HQT | 60 |
| 2.3.8.1 Entwurf von HQT-Primern mithilfe des Programms CLC-Sequence Viewer | 60 |
| 2.3.8.2 Isolierung von genomischer DNA aus Blättern | 61 |
| 2.3.8.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen | 63 |
| 2.3.8.4 Ligation in pDrive [®] -Vektor | 63 |
| 2.3.8.5 Transformation von chemokompetenten EZ-Zellen | 64 |
| 2.3.8.6 Restriktionsverdau mit <i>EcoRI</i> | 64 |
| 2.3.8.7 Entwurf von HQT-Primern mit dem CODEHOP-Programm | 65 |
| 2.3.8.8 Amplifikation des HQT-Mittelstücks | 68 |
| 2.3.8.9 Amplifikation des 3'-Endes mittels RACE-PCR | 69 |
| 2.3.8.10 Amplifikation des 5'-Endes mittels RACE-PCR | 73 |
| 2.4 Charakterisierung einer Suspensionskultur von <i>Glechoma hederacea</i> | 76 |
| 2.4.1 Etablierung einer Kalluskultur | 76 |
| 2.4.2 Etablierung einer Suspensionskultur | 77 |
| 2.4.3 Steriles Animpfen der Kulturen | 77 |
| 2.4.4 Bestimmen von Wachstumsparametern | 77 |
| 2.4.5 Herstellen des Proteinrohextrakts | 77 |
| 2.4.6 Bestimmen von Mediumparametern | 78 |
| 2.4.7 Bestimmen des Proteingehalts | 78 |
| 2.4.8 Enzymtest zur Bestimmung der Enzymaktivitäten | 78 |
| 2.4.8.1 Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL)-Aktivität | 78 |
| 2.4.8.2 Rosmarinsäuresynthase (RAS)-Aktivität | 78 |

| | |
|--|------------|
| 2.4.9 Extraktion der Chlorogen-, Kaffee- und Rosmarinsäure | 79 |
| 2.4.10 Vergleich von Dunkel- und Lichtkulturen | 79 |
| 2.5 Ozonbegasungsexperimente von <i>Melissa officinalis</i> | 79 |
| 2.5.1 Ozonbehandlung von Melissen-Pflanzen | 79 |
| 2.5.2 Untersuchungen zu Membranschäden | 80 |
| 2.5.2.1 TBARS (thiobarbituric acid reactive substances)-Test | 80 |
| 2.5.3 Untersuchungen der Photosynthesepigmente | 81 |
| 2.5.4 Histochemische und cytochemische Untersuchungen | 81 |
| 2.5.4.1 H ₂ O ₂ -Akkumulation | 81 |
| 2.5.4.2 Evansblau-Färbung | 82 |
| 2.5.5 Ökophysiologische Untersuchungen | 83 |
| 2.5.5.1 Gasaustauschparameter | 83 |
| 2.5.5.2 Chlorophyll a Fluoreszenzparameter | 84 |
| 2.5.6 Messung des Abscisinsäuregehalts über ELISA | 85 |
| 2.5.7 Bestimmung des Rosmarinsäuregehalts | 86 |
| 2.5.8 Bestimmung der PAL- und RAS-Aktivität | 87 |
| 2.5.9 Statistik | 87 |
| 2.5.10 Expressionsanalyse durch semiquantitative PCR | 87 |
| 2.5.11 Expressionsanalyse durch quantitative Real-Time-PCR | 88 |
| 2.5.12 Antioxidative Mechanismen in <i>Melissa officinalis</i> | 90 |
| 2.5.12.1 Ascorbat/Dehydroascorbat-Gehalt | 91 |
| 2.5.12.2 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl Radikal (DPPH [•])-Test | 92 |
| 2.5.12.3 H ₂ O ₂ -Gehalt | 93 |
| 2.5.12.4 Gesamtgehalt phenolischer Verbindungen | 93 |
| 2.5.12.5 Prolin-Gehalt | 94 |
| 2.5.12.6 Bestimmung der Carotinoide | 94 |
| 2.5.12.7 Katalase-Aktivität | 95 |
| 3. Ergebnisse und Diskussion | 96 |
| 3.1 Projekt 1: Versuche zur Kristallisation des CbRAS-Proteins | 96 |
| 3.1.1 Ergebnisse zur Gewinnung von CbRAS-Proteinkristallen | 96 |
| 3.1.1.1 Expression des CbRAS-Proteins in <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS | 96 |
| 3.1.1.2 Aufreinigung/Isolierung des CbRAS-Proteins aus inclusion bodies | 96 |
| 3.1.1.3 Variationsmöglichkeiten zur Isolierung des CbRAS-Proteins aus inclusion bodies | 98 |
| 3.1.1.4 PAGE unter nativen Bedingungen | 102 |
| 3.1.1.5 Expression der CbRAS in SoluBL21 TM Competent <i>E. coli</i> | 102 |
| 3.1.1.6 Optimierte Expression der CbRAS in SoluBL21 TM Competent <i>E. coli</i> | 103 |
| 3.1.1.6.1 Expression in 100 ml LB-Medium | 103 |
| 3.1.1.6.2 Bestimmung der maximalen spezifischen Aktivität des CbRAS-Proteins | 104 |
| 3.1.1.6.3 Expression in 1000 ml LB-Medium | 104 |
| 3.1.1.7 Veränderung der Imidazol-Konzentration des His-tag-Waschpuffers | 105 |
| 3.1.1.8 Reinigung des Proteins durch Gelpermeationschromatographie | 107 |
| 3.1.1.8.1 GPC Säule HiLoad TM 26/60 Superdex 200 | 107 |
| 3.1.1.8.2 GPC Säule HiLoad TM 26/60 Superdex 75 | 110 |
| 3.1.1.9 Kristallisationsversuche | 114 |
| 3.1.1.10 Abspaltung des His-tags | 116 |
| 3.1.2 Diskussion der Versuche zur Gewinnung von CbRAS-Proteinkristallen | 118 |
| 3.1.2.1 Möglichkeiten zur Affinitätsmarkierung | 118 |

| | |
|--|------------|
| 3.1.2.2 Kristallisationsversuche von Hydroxycinnamoyltransferasen | 120 |
| 3.2 Projekt 2: Untersuchungen von chimären HST/RAS- und RAS/HST-Proteinen | 124 |
| 3.2.1 Ergebnisse der Aktivitätstests von chimären HST/RAS- und RAS/HST-Proteinen | 124 |
| 3.2.1.1 Aktivitätstests der HST-RAS-Chimären | 125 |
| 3.2.1.1.1 24 h-Test der HST-RAS-Chimären | 125 |
| 3.2.1.1.2 4 h-Test der HST-RAS-Chimären | 125 |
| 3.2.1.2 Aktivitätstests der RAS-HST-Chimären | 126 |
| 3.2.1.2.1 24 h-Test der RAS-HST-Chimären | 126 |
| 3.2.1.2.2 4 h-Test der RAS-HST-Chimären | 127 |
| 3.2.2 Diskussion der Aktivitätstests mit chimären HST/RAS- und RAS-HST-Proteinen | 129 |
| 3.3 Projekt 3: Charakterisierung einer Suspensionskultur von <i>Glechoma hederacea</i> | 133 |
| 3.3.1 Ergebnisse der Charakterisierung einer Suspensionskultur von <i>Glechoma hederacea</i> | 133 |
| 3.3.1.1 Bestimmung von Wachstumsparametern | 133 |
| 3.3.1.2 Bestimmung von Mediumparametern | 134 |
| 3.3.1.3 Bestimmung des Chlorogensäure-, Kaffeesäure- und Rosmarinsäuregehalts | 134 |
| 3.3.1.4 Bestimmung der Enzymaktivitäten von PAL und RAS | 135 |
| 3.3.1.5 Vergleich von Dunkel- und Lichtkulturen | 136 |
| 3.3.2 Diskussion zur Charakterisierung einer Suspensionskultur von <i>Glechoma hederacea</i> | 138 |
| 3.3.2.1 Bestimmung der Wachstums- und Mediumsparameter | 138 |
| 3.3.2.2 Bestimmung des Chlorogensäure-, Kaffeesäure- und Rosmarinsäuregehalts | 139 |
| 3.3.2.3 Bestimmung der Enzymaktivitäten von PAL und RAS | 140 |
| 3.3.2.4 Vergleich von Dunkel- und Lichtkulturen | 140 |
| 3.4 Projekt 4: Untersuchungen zum Sekundärstoffwechsel von <i>Glechoma hederacea</i>-Pflanzen | 142 |
| 3.4.1 Sekundärstoffwechsel von <i>Glechoma hederacea</i> | 142 |
| 3.4.1.1 Optimierung der RNA-Isolierung aus Blättern, Blüten, Stängeln und Wurzeln | 142 |
| 3.4.1.1.1 RNA-Isolierung nach Chomczynski und Sacchi | 142 |
| 3.4.1.1.2 RNA-Isolierung nach Giuliano | 143 |
| 3.4.1.2 Bestimmung des Temperaturoptimums für die PCR-Amplifikation verschiedener Hydroxycinnamoyltransferasen | 143 |
| 3.4.1.3 Ergebnisse zur Untersuchung diverser „house-keeping“-Gene | 145 |
| 3.4.1.3.1 18S-ribosomale RNA (18S-rRNA) | 145 |
| 3.4.1.3.2 β -Aktin | 146 |
| 3.4.1.3.3 Elongationsfaktor 1 α (EF1 α) | 147 |
| 3.4.1.4 Expression unterschiedlicher Hydroxycinnamoyltransferasen aus Blättern, Blüten, Stängeln und Wurzeln von <i>Glechoma hederacea</i> | 149 |
| 3.4.1.5 Extraktion von Chlorogen-, Kaffee- und Rosmarinsäure aus Blättern, Blüten, Stängeln und Wurzeln von <i>Glechoma hederacea</i> | 150 |
| 3.4.1.6 Ergebnisse zur Isolierung der cDNA oder des Gens einer Lamiaceae-HQT | 151 |
| 3.4.1.6.1 Entwurf von HQT-Primern | 151 |
| 3.4.1.6.2 Entwurf von HQT-Primern mithilfe des CODEHOP-Programms | 154 |
| 3.4.1.6.3 Ergebnisse der Amplifikation des 3'-Endes mittels RACE-PCR | 160 |
| 3.4.1.6.4 Versuch der Amplifikation des 5'-Endes mittels RACE-PCR | 164 |

3.4.2 Diskussion zu Untersuchungen der *Glechoma hederacea*-Pflanzen _____ 168

| | |
|--|-----|
| 3.4.2.1 Untersuchung diverser „house-keeping“-Gene _____ | 168 |
| 3.4.2.1.1 18S-ribosomale RNA (18S-rRNA) _____ | 168 |
| 3.4.2.1.2 β -Aktin _____ | 169 |
| 3.4.2.1.3 Elongationsfaktor 1 α (EF1 α) _____ | 169 |
| 3.4.2.2 Expression diverser Hydroxycinnamoyltransferasen aus Blättern, Blüten, Stängeln und Wurzeln _____ | 170 |
| 3.4.2.3 Gehalt von Chlorogen-, Kaffee- und Rosmarinsäure in Blättern, Blüten, Stängeln und Wurzeln von <i>Glechoma hederacea</i> _____ | 171 |
| 3.4.2.4 Isolierung der cDNA-/Gensequenz einer Lamiaceae-HQT _____ | 171 |

3.5 Projekt 5: Ozonbegasungsexperimente an *Melissa officinalis* _____ 173

3.5.1 Ergebnisse der Ozonbegasungsexperimente an *Melissa officinalis* _____ 173

| | |
|---|-----|
| 3.5.1.1 Histochemische und cytochemische Untersuchungen _____ | 174 |
| 3.5.1.1.1 Evansblaufärbung _____ | 174 |
| 3.5.1.1.2 H ₂ O ₂ -Akkumulation _____ | 174 |
| 3.5.1.2 Biochemische Untersuchungen _____ | 176 |
| 3.5.1.2.1 TBARS (thiobarbituric acid reactive substances)-Test _____ | 176 |
| 3.5.1.2.2 Abscisinsäuremessungen mittels ELISA _____ | 177 |
| 3.5.1.2.3 Untersuchungen der photosynthetischen Pigmente _____ | 177 |
| 3.5.1.3 Ökophysiologische Untersuchungen _____ | 178 |
| 3.5.1.3.1 Gasaustauschparameter _____ | 178 |
| 3.5.1.3.2 Chlorophyll a Fluoreszenzparameter _____ | 180 |
| 3.5.1.4 Bestimmung des Rosmarinsäuregehalts _____ | 182 |
| 3.5.1.5 PAL- und RAS-Aktivität _____ | 182 |
| 3.5.1.6 Expressionsanalyse durch semiquantitative PCR _____ | 184 |
| 3.5.1.7 Expressionsanalyse durch quantitative Real-time PCR _____ | 185 |
| 3.5.1.8 Antioxidative Mechanismen in <i>Melissa officinalis</i> _____ | 186 |
| 3.5.1.8.1 Ascorbat/Dehydroascorbat _____ | 186 |
| 3.5.1.8.2 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl Radikal (DPPH [*])-Test _____ | 187 |
| 3.5.1.8.3 H ₂ O ₂ -Gehalt _____ | 188 |
| 3.5.1.8.4 Gesamtgehalt phenolischer Verbindungen _____ | 189 |
| 3.5.1.8.5 Prolin-Gehalt _____ | 190 |
| 3.5.1.8.6 Bestimmung der Carotinoide _____ | 190 |
| 3.5.1.8.7 Katalase-Aktivität _____ | 191 |

3.5.2 Diskussion der Ergebnisse der Ozonbegasungsexperimente von *Melissa officinalis* 193

| | |
|---|-----|
| 3.5.2.1 Histochemische und cytochemische Untersuchungen _____ | 193 |
| 3.5.2.2 Biochemische Untersuchungen _____ | 193 |
| 3.5.2.2.1 TBARS (thiobarbituric acid reactive substances)-Test _____ | 193 |
| 3.5.2.2.2 Bestimmung der Abscisinsäure _____ | 194 |
| 3.5.2.2.3 Photosynthetische Pigmente _____ | 194 |
| 3.5.2.3 Ökophysiologische Untersuchungen _____ | 195 |
| 3.5.2.3.1 Gasaustauschparameter _____ | 195 |
| 3.5.2.3.2 Chlorophyll a Fluoreszenzparameter _____ | 196 |
| 3.5.2.4 Einfluss auf den Sekundärstoffwechsel _____ | 197 |
| 3.5.2.5 Expressionsanalysen durch semiquantitative PCR und quantitative Real-time PCR _____ | 198 |
| 3.5.2.6 Diskussion der antioxidativen Mechanismen in <i>Melissa officinalis</i> _____ | 199 |
| 3.5.2.6.1 Ascorbat/Dehydroascorbat _____ | 200 |
| 3.5.2.6.2 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl Radikal (DPPH [*])-Test _____ | 201 |
| 3.5.2.6.3 H ₂ O ₂ -Gehalt und Katalaseaktivität _____ | 201 |

| | |
|--|------------|
| 3.5.2.6.4 Gesamtgehalt phenolischer Verbindungen | 203 |
| 3.5.2.6.5 Prolin-Gehalt | 203 |
| 3.5.2.6.6 Bestimmung der Carotinoide | 204 |
| 4. Summary | 205 |
| 5. Veröffentlichungen | 207 |
| 6. Referenzen | 208 |
| 7. Anhang | 230 |
| 7.1 Abkürzungen von Aminosäuren und Nukleotiden | 230 |
| 7.2 Vektorkarten | 232 |
| 7.2.1 pDrive®-Vektor | 232 |
| 7.2.2 pET-15b-Vektor | 233 |
| 7.3 Medien | 234 |
| 7.3.1 LB-Medium | 234 |
| 7.3.2 SOC-Medium | 234 |
| 7.3.3 M9-Minimalmedium | 235 |
| 7.3.4 CB-Medium | 235 |
| 7.4 Geräte und Reagenzien | 237 |
| 7.4.1 Geräte | 237 |
| 7.4.2 Reagenzien | 240 |
| 7.4.3 Molekularbiologische Reagenzien/Kits | 242 |
| 7.4.4 Kristallisationsscreens | 242 |
| 7.5 HPLC-Chromatogramme | |

1. Einleitung

1.1 *Coleus blumei*

Coleus blumei Benth. (syn. *Solenostemon scutellarioides* L. Codd., engl.: painted nettle) gehört zur Familie der Lamiaceae (Unterfamilie: Nepetoideae) und ist in Südostasien und Malaysia beheimatet (Rogers 2008). Der spezifische Artnamen „*scutellarioides*“ bedeutet schildförmig (Harrison 2012). Die Buntnessel (siehe Abbildung 1) ist eine krautige Pflanze (60-75 cm Höhe) mit für Lamiaceae typisch vierkantigem Stängel und dekussierten, zugespitzten Blättern. Die lila gefärbten Lippenblüten erscheinen in einer Traube zwischen Juli und September (Bajaj 1994). Halpern et al. (2004) schilderten einen psychogenen Effekt von *Coleus blumei*. In der Tat wurden Blätter von *Coleus blumei* und *Coleus pumilus* anstatt *Salvia divinorum* von einigen Mazateken-Völkern in Mexiko aufgrund ihrer halluzinogenen Wirkung gekaut (Wasson 1962; Schultes und Hofmann 1992). Obwohl in der Pflanze Rosmarinsäure (RA) und Kaffeesäure nachgewiesen wurden (Petersen und Alfermann 1988; Petersen et al. 1993; Petersen et al. 1994; Bauer et al. 2009; Vuković et al. 2013), handelt es sich jedoch um keine Arzneipflanze aus dem europäischen Arzneibuch (Ph.Eur). Die dekorative Pflanze wurde 1935 von Fischnich erstmalig erwähnt. Später fungierte sie als eine der ersten Suspensionskulturen, die zur Untersuchung der Biosynthese und Produktion der RA etabliert wurde (Razzaque und Ellis 1977; Zenk et al. 1977). Es existieren zahlreiche Sorten, deren Blätter unterschiedliche Färbungen aufweisen (Rogers 2008).



Abbildung 1: *Coleus blumei*

1.2 *Glechoma hederacea*

Glechoma hederacea L. (efeublättriger, gewöhnlicher Gundermann, Gundelrebe, engl.: creeping charlie, grill-over-the-ground, siehe Abbildung 2) ist eine krautige, mehrjährige Pflanze. Sie blüht von April bis Juni und erreicht eine Wuchshöhe von 10-40 cm. *Glechoma* gehört zur Familie der Lamiaceae (Unterfamilie: Nepetoideae). Der Spross ist vierkantig, häufig blauviolett gefärbt und haarig. Die Blätter sind kreuzgegenständig, wobei die Blattspreite als rundlich-nierenförmig bezeichnet wird und bei geringer Lichtexposition recht große Ausmaße annehmen kann (Abbildung 3). Die Blüten sitzen als zwei- bis fünfblütige Scheinquirle in den Achseln der Laubblätter. Die violette Blütenkrone ist zweilippig und 15-22 mm lang, die Unterlippe ist dreizipflig, während die Oberlippe vorn schwach ausgerandet ist. Verbreitet ist die Gundelrebe in ganz Europa bis nach Sibirien, China und Amerika. Als pharmazeutisch interessante Inhaltsstoffe sind ätherisches Öl (α -, β -Pinen, Menthol, Limonen), Sesquiterpene (Glechomafuran, Glechomanolid), Triterpene (Ursolsäure, Oleanolsäure), Phenolcarbonsäuren (Rosmarinsäure, Chlorogensäure, Kaffeesäure, Ferulasäure, Sinapinsäure), Flavonoide (Glykoside des Apigenins, Luteolins, Quercetins) und Alkaloide (Hederacin A und B) zu nennen (http://www.medizinalpflanzen.de/systematik/6_droge/glecom-h.htm).



Abbildung 2: *Glechoma hederacea*



Abbildung 3: Laubblatt von *Glechoma hederacea*

Schon seit Jahrhunderten wird *Glechoma*-Extrakt in der Volksmedizin bei Gallensteinleiden, Harnsteinleiden, Entzündungen, Erkältung, Asthma und bei Ödemen eingesetzt (Kim et al. 2011). Außerdem konnten Kováts et al. (2011) die stärkste antimikrobielle Aktivität des *Glechoma*-Extrakts in Extrakten von 12 Lamiaceae-Spezies nachweisen. Ha et al. zeigten 2011 einen depigmentierenden Effekt eines *Glechoma*-Extrakts auf UV-induzierte Hyperpigmentierung. Auch Qiao et al. (2012) demonstrierten eine Hemmung der Melanogenese in B16-Melanozyten durch einen *Glechoma*-Extrakt, der dabei nicht zytotoxisch wirkte. Möglicherweise könnte *Glechoma* als pflanzliches Additiv in Cremes gegen Pigmentstörungen eingesetzt werden. Weitere Studien konnten einen antientzündlichen Mechanis-

mus bei Krankheiten zeigen, welche eine verstärkte Makrophagenproduktion auslösen (Milovanovic et al. 2010).

Glechoma hederacea kann als interessantes Untersuchungsobjekt angesehen werden, da die Gundelrebe Chlorogensäure (CA), RA und Kaffeesäure akkumuliert (Petersen et al. 2009). Demzufolge können verschiedene Hydroxycinnamoyltransferasen, welche zur Biosynthese dieser Sekundärstoffe unabdingbar sind, aus ein und derselben Pflanzenart analysiert werden.

1.3 *Melissa officinalis*

Die Zitronenmelisse (*Melissa officinalis* L., engl.: lemon balm) gehört zur Familie der Lamiaceae (Unterfamilie: Nepetoideae). Sie kann eine Höhe von ca. 1 m erreichen. Die Blattform ist nesselartig mit grob kerbig gesägter Spreite. Der Stängel ist, wie für Lamiaceae typisch, vierkantig und kaum behaart (Abbildung 4). Die Krone ist weißlich mit ungefähr gleichlanger Ober- und Unterlippe. *M. officinalis* ist im östlichen Mittelmeergebiet und in Westasien beheimatet. Ihr zitronenartiger Duft hat zu der Namensgebung geführt. Der Hauptinhaltsstoff ist ätherisches Öl (0,02-0,8%). Dieses enthält hauptsächlich Mono- und Sesquiterpene (Citronellal, Geranial, Geraniol, β -Caryophyllen, Caryophyllenepoxid und Germacren-D). Für die therapeutische Wirkung ist ebenso der Gehalt an Phenolcarbonsäuren ausschlaggebend. Diese setzen sich aus RA, CA, Kaffeesäure, p-Cumarsäure und Ferulasäure zusammen (Wichtl 2002; http://www.medizinalpflanzen.de/systematik/6_droge/melis-fo.htm).

Ein bekanntes Arzneimittel mit wässrigem Melissenextrakt ist die Creme Lomaherpan[®], welche die Anlagerung des *Herpes simplex* Virus 1 an die Wirtszelle verhindert (Astani et al. 2012). Des Weiteren existieren noch diverse andere Arzneimittel wie z.B. Gastrovegetalin[®] (Melissenblätter-Trockenextrakt) bei funktionellen Gastrointestinaltrakt-Beschwerden, Euvegal[®] bei nervös bedingten Einschlafstörungen (Melissenblätter-Trockenextrakt), Sedinfant[®] (Dickextrakt aus Melissenblättern) und ME-Sabona[®] (Melissenblätter-Trockenextrakt) bei Einschlafstörungen und Blähungen.

Melisse wurde schon in der Antike als Arzneipflanze genutzt. Vergil und Plinius postulierten einen Nutzen in der Imkerei. Der griechische Arzt Dioscurides (1. Jh. n. Chr.) empfahl sie bei Menstruationsbeschwerden, Bauchschmerzen und Rheuma (Koch-Heitzmann und Schultze 1988; Babulka 2005; Weitzel 2009). Zusammengefasst besitzt *M. officinalis* sedative (beruhigend), karminative (blähungstreibend), spasmolytische (krampflösend), antibakterielle und antivirale Eigenschaften, welche hauptsächlich durch den Gehalt an ätherischen Ölen und Phenolcarbonsäuren hervorgerufen werden. Neueste Studien zeigen jedoch auch neuroprotektive Wirkmechanismen nach Insult (Schlaganfall) (Bayat et al. 2012) sowie anti-

oxidative Eigenschaften bei oxidativem Stress, der durch Mangan in Mäusehirnen ausgelöst wurde (Martins et al. 2012).



Abbildung 4: *Melissa officinalis*

1.4 Chlorogensäure, Kaffeesäure und Rosmarinsäure

Zahlreiche Pflanzenarten diverser Familien weisen sowohl CA als auch RA auf. Als Beispiele aus der Gruppe der Gefäßsporenpflanzen sind aus der Familie Blechnaceae die beiden Vertreter *Blechnum brasiliense* und *B. gibbum* zu nennen. Aus den basalen Ordnungen ist *Chloranthus officinalis* ein Stellvertreter. Bei den Monokotyledonen existieren zum Beispiel mehrere Vertreter bei den Cannaceae und den Marantaceae. Bei den zweikeimblättrigen Pflanzen gibt es in der Familie der Lamiaceae beispielsweise die Vertreter *Glechoma hederacea* und *Dracocephalum spec.*, bei den Apiaceae *Astrantia major* und diverse Vertreter bei den Boraginaceae/Hydrophyllaceae (Petersen et al. 2009). Laut Vogt (2010) sind RA und CA die beiden hauptsächlichen löslichen Phenylpropanoide in Solanaceae und Lamiaceae. Kaffeesäure und ihre beiden Derivate CA und RA werden vermutlich als Abwehrstoffe gegen Pathogene und Herbivore sowie zum UV-Schutz synthetisiert (Clé et al. 2008; Petersen et al. 2009; Sánchez-Campillo et al. 2009). Außerdem wird vermutet, dass sie als Antioxidantien fungieren (Petersen et al. 2009; Vogt 2010).

1.4.1 Rosmarinsäure

1.4.1.1 Vorkommen

Rosmarinsäure (RA) wurde 1958 zuerst von Scarpati und Oriente aus Rosmarinblättern (*Rosmarinus officinalis*) als Reinstoff isoliert. Den beiden italienischen Chemikern gelang außerdem im selben Jahr die Strukturaufklärung. Bei der Analyse von Kaffeesäurederivaten

in der Familie der Labiatae konnte Herrmann 1959 zeigen, dass Rosmarinsäure der hauptsächliche Vertreter in dieser Familie ist und plante, sie Labiatensäure zu nennen.

Rosmarinsäure ist ein Ester aus Kaffeesäure und 3,4-Dihydroxyphenyllactat. Sie kommt hauptsächlich in Spezies der Lamiaceae, besonders in der Unterfamilie Nepetoideae, und in der Familie der Boraginaceae, aber auch in anderen Familien (Mølgaard und Ravn 1988), selbst in *Blechnum*-Farnen (Häusler et al. 1992) und Hornmoosen (Takeda et al. 1990) vor. Bei der Analyse von 240 Pflanzenarten wurde eine Akkumulation von RA ebenso in Marantaceae entdeckt (Abdullah et al. 2008).

Es wird vermutet, dass Rosmarinsäure in Pflanzen als Teil des Abwehrsystems gegen Infektionen durch Pilze und Bakterien dient. Pharmakologisch interessant wird RA durch ihre antibakterielle, antivirale, antioxidative und antiinflammatorische Wirkung (Gracza et al. 1985; Parnham und Kesselring 1985; Barberini et al. 2013). Außerdem konnte durch Guo et al. (2004) eine Aktivität gegen pflanzenpathogene Pilze gezeigt werden.

Eine weitere therapeutische Option beim Menschen ist die Prävention gegen Alzheimer. Es wurde untersucht, welchen Einfluss phenolische Substanzen (Curcumin, Ferulasäure, Myricetin, Nordihydroguajaretsäure (NDGA) und Rosmarinsäure) auf die Hemmung der Amyloid- β -Aggregation haben. Immunhistochemisch konnte gezeigt werden, dass sowohl in der NDGA- als auch in der RA-Gruppe die Amyloid- β -Plaques-Konzentration signifikant gesunken war. In der Probandenfraktion, welche mit RA behandelt wurde, stieg das Level des TBS (Tris-buffered saline)-löslichen Amyloid- β -Monomers an, während das des toxischen Amyloid- β -Oligomers sank. Deshalb wird die Behauptung aufgestellt, dass RA den Amyloid- β -Aggregationsweg von A- β -Monomeren zu A11-positiven Oligomeren hemmt. Nach einer intracerebroventrikulären Amyloid- β_{25-35} -Injektion verhinderte eine i.p. Injektion von RA Gedächtnisbeeinträchtigungen und durch Amyloid- β hervorgerufene Neurotoxizität durch aktives Abfangen von reaktiven Sauerstoffspezies (z.B. ONOO⁻). In der mit NDGA behandelten Fraktion konnte ein Ansteigen der Menge des toxischen Amyloid- β -Oligomers registriert werden, während die Konzentration des TBS-löslichen Amyloid- β -Monomers stagnierte (Hamaguchi et al. 2009).

Die antiinflammatorische Aktivität der RA lässt sich durch eine Inaktivierung der C3-Konvertase im Komplementsystem erklären (Parnham und Kesselring 1985; Englberger et al. 1988). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass RA sowohl die Synthese als auch die Freisetzung von Leukotrienen im Biosyntheseweg der Arachidonsäure hemmt (Kimura und Okuda 1987).

1.4.1.2 Biosynthese

Der erste Bericht zur Biosynthese der RA, welcher die Mitwirkung von zwei aromatischen Aminosäuren (AS) L-Tyrosin und L-Phenylalanin demonstrierte, wurde von Ellis und Towers (1970) veröffentlicht. RA ist der zweithäufigste Ester der Kaffeesäure im Pflanzenreich und dessen Biosyntheseweg wurde zuerst in *Mentha arvensis* und *Mentha x piperita* untersucht. Die Anwendung der ¹⁴C-markierten Komponenten zeigte, dass der Kaffeesäurerest aus

Phenylalanin über *trans*-Zimtsäure und 4-Cumarsäure, der 3,4-Dihydroxyphenylmilchsäurerest aus Tyrosin und Phenylalanin gebildet wird. Diese Ergebnisse entsprachen den Fütterungsstudien mit Zellkulturen von *Coleus blumei* (Razzaque und Ellis 1977). Seitdem wurde der komplette Biosyntheseweg hauptsächlich in dieser Pflanze aufgeklärt (Petersen et al. 1993).

Der allgemeine Phenylpropanstoffwechsel startet mit L-Phenylalanin, welches zur *t*-Zimtsäure umgewandelt wird (Abbildung 5). Diese Umwandlung wird durch das Enzym Phenylalanin Ammoniak-Lyase katalysiert (PAL, EC 4.3.1.24). Das zweite Enzym des Stoffwechsels ist Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H, EC 1.14.13.11), eine Cytochrom-P450 (CYP)-Monooxygenase. CYP-Enzyme sind Hämproteine, die nach ihrer ungewöhnlichen Lage der Soret-Bande des Komplexes mit Kohlenmonoxid bei 450 nm benannt wurde, wobei der Buchstabe P für Pigment steht (Klingenberg 1958). Durch die Aktivität der C4H wird Zimtsäure zu 4-Cumarsäure hydroxyliert, welche als Coenzym A-Thioester durch die Hydroxyzimtsäure:Coenzym A Ligase (4CL, EC 6.2.1.12) aktiviert wird (Petersen et al. 1993). Die Tyrosin Aminotransferase (TAT, EC 2.6.1.5) katalysiert die Transaminierung von Tyrosin mit 2-Oxoglutarat als Aminoakzeptor zu 4-Hydroxyphenylpyruvat und Glutamat (De-Eknamkul und Ellis 1987a). Erstmals charakterisiert und gereinigt wurden zwei Isoformen des Enzyms aus Suspensionskulturen von *Anchusa officinalis* (De-Eknamkul und Ellis 1987b). Auch in den Kulturen von *Coleus blumei* ließen sich zwei Isoformen nachweisen (Kempin et al. 1993). Die Hydroxyphenylpyruvat Reduktase (HPPR, EC 1.1.1.237) katalysiert die Reduktion von Hydroxyphenylpyruvat zu dem entsprechenden Hydroxyphenyllactat (Petersen und Alfermann 1988; Häusler et al. 1991). Für diese Reaktion wird NADH oder NADPH benötigt. Die erstmalige Beschreibung der HPPR erfolgte aus Suspensionskulturen von *Coleus blumei* (Petersen und Alfermann 1988). Die Intermediate 4-Cumaroyl-CoA und 4-Hydroxyphenyllactat werden durch die Rosmarinsäuresynthase (RAS, EC 2.3.1.140) verestert. Der systematische Name lautet Hydroxycinnamoyl-CoA: Hydroxyphenyllactat Hydroxycinnamoyltransferase. In dieser Arbeit wird jedoch weiterhin die Bezeichnung RAS verwendet. Sie verestert, unter Abspaltung von CoA, die aliphatischen Seitenketten 4-Cumaroyl-CoA und 4-Hydroxyphenyllactat (pHPL) zu 4-Cumaroyl-4'-Hydroxyphenyllactat (pC-pHPL) (Petersen und Alfermann 1988; Petersen et al. 1993). Neben diesen Substraten akzeptiert die RAS auch Caffeoyl-CoA und 3,4-Dihydroxyphenyllactat (DHPL). Die Affinität der RAS zu 4-Cumaroyl-CoA und pHPL ist jedoch höher, wie durch Konkurrenzexperimente bestimmt werden konnte (Petersen 1991). Dementsprechend entsteht in dem Syntheseweg zunächst 4-Cumaroyl-4'-Hydroxyphenyllactat (Petersen et al. 1993). Die terminalen Schritte werden durch die membrangebundenen Cytochrom P450 3/3'-Hydroxylasen (CYP98A14, C3/3'H), welche aromatische 3- und 3'-Hydroxylgruppen einführen, katalysiert (Petersen et al. 1993; Petersen 1997; Eberle et al. 2009, siehe Abbildung 5).

In den folgenden Abschnitten werden die Enzyme näher beschrieben, die in dieser Arbeit detaillierter untersucht wurden:

Das tetramere Enzym PAL ist eines der meist untersuchten Sekundärstoffwechsellenzyme im Pflanzenreich (Koukol und Conn 1961; Weitzel und Petersen 2010; Richet et al. 2012). Ihre Aktivität katalysiert die Desaminierung von Phenylalanin unter der Bildung von *t*-Zimtsäure und Ammoniak. Außerdem ist die PAL ein wichtiges Schlüsselenzym, welches den Primär- und Sekundärstoffwechsel von Pflanzen verbindet (Dixon und Pavia 1995).

Die Nukleotidsequenzen von zwei PAL-Genen aus *Phaseolus vulgaris* wurden als eine der Ersten von Cramer et al. (1989) ermittelt. Das erste Gen kodiert für ein Protein, das 712 AS aufweist. Das zweite Gen kodiert für ein Polypeptid mit 710 AS und enthält ein Intron an der gleichen Stelle wie das erste Gen. Ein PAL-Gen aus *Melissa officinalis* wurde kürzlich isoliert (Weitzel und Petersen 2010). Das Gen enthält ein Intron und kodiert für ein Protein, welches 836 AS enthält. Durch Southern-Blot wurden zwei Genkopien der PAL nachgewiesen. Die PAL aus z.B. *Phaseolus vulgaris* wird durch (posttranslationale) Phosphorylierung deaktiviert und durch Dephosphorylierung aktiviert (Bolwell 1992). Die Katalyse der oxidativen Ammoniakeliminierung aus Phenylalanin ist der primäre Schritt in der Biosynthese zahlreicher Sekundärstoffe in Pflanzen, z.B. Monolignole, Lignin, Lignane, Cumarine, Flavonoide, Isoflavonoide, Hydroxyzimtsäureester und andere Polyphenole. Verschiedene Studien zeigten einen starken Anstieg der spezifischen PAL-Aktivität durch abiotische und biotische Stimuli, z.B. Kälte oder ein Angriff durch verschiedene Pathogene (Oh et al. 2009; He et al. 2012; Silva et al. 2012).

4CL-Gene wurden aus verschiedenen Pflanzenfamilien isoliert, wo sie normalerweise in kleinen Genfamilien mit zwei bis fünf Mitgliedern existieren (Sun et al. 2013). In vielen Pflanzen gibt es verschiedene Isoenzyme von 4CL, die verschiedene Zimtsäuren (4-Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure oder Sinapinsäure) akzeptieren (Lindermayr et al. 2002). Diese Isoformen zeigen unterschiedliche Expressionsmuster. Dadurch wird impliziert, dass sie verschiedene Rollen im Phenylpropanstoffwechsel tragen. Es konnte gezeigt werden, dass 4CL-Proteine zu verschiedenen Evolutionsaltersklassen gehören. Klasse I 4CLs sind für die Biosynthese von Lignin und anderen Phenylpropanoiden wichtig, während Klasse II 4CLs bei der Biosynthese von Flavonoiden eine Rolle spielen (Cukovic et al. 2001). Ein 4CL-Gen wurde aus *M. officinalis* von Weitzel und Petersen (2010) isoliert, welches für ein Protein mit 540 AS kodiert und zur Klasse I gehört. Die Analyse mittels Southern-Blot zeigte das Vorhandensein von mindestens zwei Genkopien.

TAT ist das erste Enzym in dem von Tyrosin ausgehenden Weg der RA-Biosynthese (De-Eknankul und Ellis, 1987a). Das Produkt pHPP dient als Vorläufer der Homogentisinsäure, welche für die Bildung von Plastochinonen und Tocopherolen bedeutend ist (Kim und Petersen 2002; Huang et al. 2008). Außerdem ist es das Substrat für HPPR, das Enzym welches pHPL, den Vorläufer der RA, bildet (Petersen und Alfermann 1988). Da pHPP kein Zwischenprodukt der AS-Biosynthese in Pflanzen ist, muss es über den „Umweg“ mit Tyrosin gebildet werden (De-Eknankul und Ellis, 1987b). Die Substratspezifität der TAT wurde eingehend von De-Eknankul und Ellis (1987b) untersucht. Bei der Verwendung von α -Ketoglutarat (2-Oxoglutarat) als Aminoakzeptor wurden die aromatischen AS L-Tyrosin und in geringerem Maße auch L-Phenylalanin akzeptiert. Das Ziel war die Bestimmung des

optimalen Aminoakzeptors. Deshalb wurden diverse Reaktionen von L-Tyrosin mit α -Ketosäuren in Anwesenheit von TAT untersucht. Sowohl α -Ketoglutarat als auch Oxallessigsäure erwiesen sich als äquivalente, wirkungsvolle Reaktionspartner. Substrate der Aminotransferase sind neben AS auch Zwischenprodukte des Citratzyklus. Pyridoxalphosphat (Wirkform des Vitamin B₆) dient hier als Cofaktor. Bei Transaminierungsreaktionen wird die Aminoform der AS an die Aldehydgruppe des enzymgebundenen Pyridoxalphosphats gebunden. Die Aminogruppe bleibt an das Pyridoxalphosphat gebunden und wird auf die Ketosäure übertragen. Die Transaminierungsreaktionen sind reversibel (Reinhard et al. 2001).

Das erste RAS-Gen wurde 2006 von Berger et al. kloniert und als BAHD-Acyltransferase identifiziert (siehe Kapitel 1.5). Das Enzym wurde von Petersen und Alfermann (1988) in *Coleus blumei*-Zellkulturen entdeckt. Die RAS aus *Coleus blumei* oder *Melissa officinalis* zeigt eine Substratspezifität für Hydroxyphenyllactat und akzeptiert weder Shikimat oder Chinat. Außerdem werden auch Phenylmilchsäure und 3,4-Dihydroxyphenylmilchsäure von der CbRAS akzeptiert (Sander 2010). Anders reagiert die RAS aus *Lavandula angustifolia*, welche u.a. auch Shikimat akzeptiert (Landmann et al. 2011). *Melissa officinalis* enthält nur eine Genkopie für die RAS, welche für ein Protein mit 427 AS kodiert und eine 82%ige Ähnlichkeit zu der korrespondierenden RAS aus *Coleus blumei* hat (Weitzel und Petersen 2011).

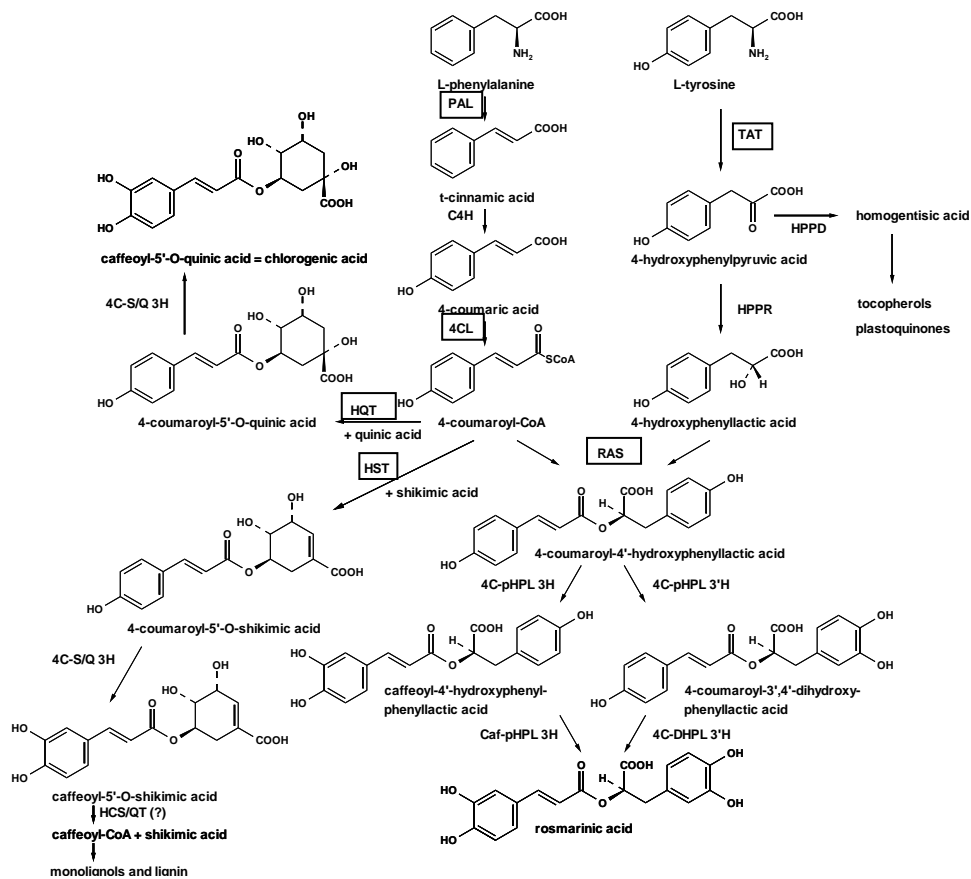


Abbildung 5: Biosyntheseweg von Chlorogensäure, Rosmarinsäure und Monolignolen/Lignin. Die Boxen markieren die in dieser Arbeit untersuchten Enzyme. PAL: Phenylalanin Ammoniak-Lyase, C4H: Zimtsäure 4-Hydroxylase; 4CL: Hydroxyzimtsäure:Coenzym A Ligase; TAT: Tyrosin Aminotransferase; HPPD: Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase; HPPR: Hydroxyphenylpyruvat Reduktase; RAS: Rosmarinsäuresynthase; HQT: Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinat Hydroxycinnamoyltransferase; HST: Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat Hydroxycinnamoyltransferase; HCSQT: Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat/Chinat Hydroxycinnamoyltransferase; 4C-pHPL 3H, 4C-pHPL 3'H: 4-Cumaroyl-4'-Hydroxyphenyllactat 3/3'-Hydroxylasen; 4C-DHPL 3'H: 4-Cumaroyl-3',4'-Dihydroxyphenyllactat 3-Hydroxylase; 4C-S/Q 3H: 4-Cumaroyl-Shikimat/Chinat 3-Hydroxylase

1.4.2 Chlorogensäure

1.4.2.1 Vorkommen

Der erste Bericht, der sich mit der Chlorogensäure befasste, wurde wahrscheinlich 1837 von Robiquet und Boutron nach der Analyse von Kaffeebohnen veröffentlicht, die Bezeichnung wurde 1846 von Payen eingeführt (Clifford 1999). 1932 wurde gezeigt, dass CA ein Kaffeesäurekonjugat der Chinasäure ist (Fischer und Dangschat 1932). Die Namensgebung leitet sich wahrscheinlich von der Grünfärbung in alkalischer Lösung ab (Yabuta et al. 2001).

CA gehört zu einer Familie von Estern, die aus *trans*-Zimtsäuren und Chinasäure (1 α , 3 α , 4 α , 5 β -Tetrahydroxycyclohexancarbonsäure) gebildet werden. Die Chinasäure besitzt an C1/3 axiale Hydroxylgruppen (OH-Gruppe) und an C4/5 äquatoriale OH-Gruppen. Während der Verarbeitung kann eine *trans-cis* Umlagerung stattfinden. Die 5-O-Caffeoylchinasäure kommt am häufigsten vor (IUPAC 1976). Außerdem existieren 4-Cumaroylchinasäuren, Feruloylchinasäuren, Di-, Tri- und Tetra-Caffeoyl-chinasäuren (Clifford 1999). Die beiden

Letztgenannten sind häufig in Asteraceae anzutreffen (Merfort 1992). Die 1,5-Dicaffeoylchinasäure wird als Cynarin bezeichnet und ist in der Artischocke beispielsweise nach einer Heißwasserextraktion zu finden (Fritsche et al. 2002; Wichtl 2002). Die 3,5-Dicaffeoylchinasäure wurde im Kaffee nachgewiesen, die zu 3,4- und 4,5-Dicaffeoylchinasäuren isomerisiert (Lallemand et al. 2012b).

Es finden sich häufig Berichte, dass bestimmte Nahrungsmittel für den Menschen nicht nur der Nährstoffaufnahme dienen, sondern auch eine präventive Funktion bei kardiovaskulären Krankheiten sowie Krebs aufweisen (Ness und Powles 1997; Segasothy und Phillips 1999). Phenole sind die am weitesten verbreiteten Antioxidantien in Pflanzen. CA hat eine hohe antioxidative Kapazität, welche möglicherweise noch stärker als die von Flavonoiden ist (Niggeweg et al. 2004). Außerdem scheint sie auch zytoprotektive Eigenschaften gegenüber der Toxizität, welche durch α -Synuclein ausgelöst wird, bei Parkinsonerkrankungen zu besitzen (Teraoka et al. 2012). CA kann direkt vom Dünndarm resorbiert werden (Plumb et al. 1999; Williamson et al. 2000; Nardini et al. 2002), der größte Anteil wird im Dickdarm jedoch von Esterasen direkt zu Kaffeesäure hydrolytisch gespalten, die dann direkt absorbiert wird (Niggeweg et al. 2004).

Chlorogensäure (CA) ist innerhalb der Familie der Lamiaceae ziemlich weit verbreitet (Litvinenko et al. 1975; Pedersen 2000; Petersen et al. 2009). Darüber hinaus ist sie in diversen anderen Familien, wie z.B. in Blechnaceae, Chloranthaceae, Juncaceae, Cannaceae, Marantaceae, Geraniaceae, Aquifoliaceae, Hydrangeaceae, Malvaceae, Rubiaceae, Plantaginaceae, Scrophulariaceae, Solanaceae, Apiaceae, Araliaceae, Asteraceae, Caprifoliaceae oder Dipsacaceae zu finden (Petersen et al. 2009). Kaffeebohnen sind die reichhaltigste Quelle für CA (Clifford 1999). Es wird geschätzt, dass eine Tasse Kaffee zwischen 20 und 675 mg CA enthält (Clifford und Walker 1987).

CA hat nicht nur im menschlichen Organismus eine antioxidative Wirkung. Nach Hemmung der CA-Akkumulation in Tabakpflanzen konnte ein beschleunigtes Absterben von älteren Blättern und eine verstärkte Produktion von Lipid-Malondialdehyd beobachtet werden. Dies zeigt, dass Chlorogensäure die Pflanze vor Lipidperoxidation, welche z.B. durch abiotischen Stress ausgelöst wird, schützt (Tamagnone et al. 1998). Eine weitere essentielle Funktion der CA ist die UV-Protektion (Clé et al. 2008). In der Pflanze befindet sich die Chlorogensäure in Vakuolen und im Apoplast, wo sie u.a. Radikalfängereigenschaften aufweist (Takahama et al. 1999; Sakihama et al. 2002). In der Vakuole kann CA zudem einen Komplex mit Tropanalkaloiden bilden, der für deren Transport in die Vakuole wichtig ist (Pardo Torre et al. 2013).

1.4.2.2 Biosynthese

Die Biosynthese verläuft ähnlich der Biosynthese der RA (siehe Abbildung 5). Die Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinat Hydroxycinnamoyltransferase (HQT, EC 2.3.1.99) transferiert den 4-Cumaroyl- oder 4-Caffeoylrest auf die Chinasäure. Durch diese Acylierung wird 4-Cumaroylchinat oder 5-O-Caffeoylchinat gebildet. (Heller und Kühnl 1985; Kühnl et al. 1987; Franke et al. 2002; Kim et al. 2013). Früher nahm man an, dass die HQT die Bildung der CA

aus Caffeoyl-CoA und Chinasäure bei Tomaten, Tabak und Kartoffeln katalysiert (Stöckigt und Zenk 1975; Rhodes und Wooltorton 1976; Ulbrich und Zenk 1979). Die möglichen Mechanismen der CA-Biosynthese werden in Kapitel 3.1.2.2 näher erläutert. Es ist jedoch oftmals schwierig, eine klare Präferenz der Hydroxycinnamoyltransferasen (HCTs) für Chinat oder Shikimat zu bestimmen (Lepelley et al. 2007; Sonnante et al. 2010; Lallemand et al. 2012b; Walker et al. 2013). Einige HCTs nutzen nur Shikimat als Substrat (Hoffmann et al. 2003, Sander und Petersen 2011). Andere HCTs haben wiederum eine stärkere Präferenz für Chinat (Niggeweg et al. 2004; Comino et al. 2007; Comino et al. 2009; Kim et al. 2013). Diejenigen HCTs, die beide Substrate akzeptieren, bezeichnet man als Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat/Chinat Hydroxycinnamoyltransferasen (HCSQTs) und HQT sowie HST als promiskuitive Enzyme (Sander 2010; Petersen 2013). Somit kann eine evolutionäre Verbindung von RAS, HQT und HST angenommen werden (Petersen 2013).

1.4.3 Kaffeesäure

1.4.3.1 Vorkommen

Kaffeesäure kommt ubiquitär im Pflanzenreich vor, besonders - wie der Name schon sagt - im Kaffee (Brezová et al. 2009), daneben z.B. in Blaubeeren, Äpfeln und Kiwi (Clifford 1999; Manach et al. 2004). Neben CA und Ferulasäure sind Kaffeesäure und ihre Ester die häufigsten Vertreter der Polyphenole (Scalbert und Williamson 2000; Manach et al. 2004) und repräsentieren rund 75-100% des Gesamtgehalts an Hydroxyzimtsäureestern (Manach et al. 2004). Wenn man sich die Struktur der Kaffeesäure vor Augen führt (Abbildung 6), ist sie mit ihren zwei phenolischen Hydroxylgruppen ein typisches H-Donor-Antioxidans und ein starker OH-Radikalfänger (Brezová et al. 2009). Außerdem dient sie in Pflanzen dem UV-Schutz (Shapiro et al. 2009b).

Im menschlichen Organismus existieren in der Leber oder im Magensaft keine Esterasen, welche CA spalten könnten, um Kaffeesäure freizusetzen. Dies kann erst in der Mikroflora des Dickdarms stattfinden (Manach et al. 2004). Nach der Absorption ist Kaffeesäure ziemlich stabil und hat ein ähnliches antioxidatives Potenzial wie CA, da sie ebenfalls ein „ROS-Fänger“ ist (Rice-Evans et al. 1997; Couteau et al. 2001; Kikuzaki et al. 2002; Scalbert et al. 2002).

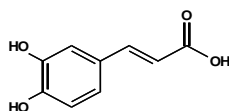


Abbildung 6: Struktur der Kaffeesäure

1.4.3.2 Biosynthese

Die Biosynthese beginnt mit der aromatischen AS L-Phenylalanin (siehe Kapitel 1.4.1.2 und Abbildung 5). Nach einer Hydroxylase für die 3-Hydroxylierung der 4-Cumarsäure wurde lange geforscht. Heute wird postuliert, dass zunächst ein 4-Cumaroyl-ester durch eine BAHD-Acyltransferase mit z.B. Shikimisäure gebildet und die 3,4-Dihydroxysubstitution durch eine

CYP98A-Hydroxylase durchgeführt wird. Der Caffeoylrest wird wieder auf Coenzym-A übertragen, z.B. um Monolignole herzustellen (Petersen und Matern 2010; Umezawa 2010).

1.5 BAHD-Acyltransferasen

Das Akronym **BAHD** leitet sich aus den vier ersten charakterisierten Enzymen dieser Familie ab: *Clarkia breweri* Benzylalkohol O-Acetyltransferase (**BEAT**), *Gentiana triflora* Anthocyan O-Hydroxycinnamoyltransferase (**AHCT**), *Dianthus caryophyllus* Anthranilat N-Hydroxycinnamoyl-/Benzoyltransferase (**HCBT**) und *Catharanthus roseus* Desacetylvindolin 4-O-Acetyltransferase (**DAT**) (St. Pierre und De Luca 2000). Mitglieder dieser Pflanzenfamilie wurden in Pflanzen und Pilzen detektiert. Sie sind monomere Enzyme und haben eine molekulare Masse von 48-55 kDa. Es existieren durchschnittlich 445 AS in einem BAHD-Protein (D'Auria 2006). Diese Superfamilie ist durch zwei hochkonservierte Sequenzmotive charakterisiert: das HxxxD(G)-Motiv, welches den katalytisch aktiven Histidinrest enthält und sich nahe dem katalytischen Zentrum des Enzyms befindet, und das DFGWG-Motiv, das nahe bei dem C-Terminus lokalisiert ist (D'Auria 2006; Sander und Petersen 2011). Zielgerichtete Mutageneseexperimente haben gezeigt, dass Deletionen oder Mutationen einer der beiden Motive in einer stark reduzierten Enzymaktivität resultieren. Man geht davon aus, dass alle identifizierten Mitglieder der BAHD-Familie im Zytosol lokalisiert sind, da keine Signalpeptide oder andere Sequenzen existieren, welche auf eine Lokalisation in den Organellen hinweisen würden (D'Auria 2006). Ma et al. (2005) klärten an der Vinorinsynthase aus *Rauvolfia serpentina* die erste Kristallstruktur eines BAHD-Mitglieds auf.

Hydroxycinnamoyltransferasen (HCTs) dieser Familie katalysieren den Transfer eines 4-Cumaroyl-, Caffeoyl- oder Feruloylrests, welcher von einem aktivierten Coenzym-A-Thioester stammt, auf z.B. Shikimat durch die Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat Hydroxycinnamoyltransferase (HST, EC 2.3.1.133) (Hoffmann et al. 2003), auf Chinat durch die Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinat Hydroxycinnamoyltransferase (HQT) (Niggeweg et al. 2004) oder 4-Hydroxyphenyllactat durch die Hydroxycinnamoyl-CoA:Hydroxyphenyllactat Hydroxycinnamoyltransferase (RAS) (Berger et al. 2006). Eine Herunterregulierung von HCTs, welche Shikimat als Akzeptorsubstrat verwenden, beeinflusste sowohl die Menge als auch den Aufbau von Lignin in *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana*, *Pinus taeda* und *Medicago sativa* (Hoffmann et al. 2004, 2005; Wagner et al. 2007; Shadle et al. 2007). Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass die HST in der Bildung von Monolignolen über einen Shikimatester als Zwischenprodukt involviert ist (Hücherig und Petersen 2012). Auf der anderen Seite wurden die Level von CA, nach Herunterregulation einer HCT, die hauptsächlich Chinat als Akzeptor nutzt, reduziert (Niggeweg et al. 2004). Sander (2010) isolierte jeweils zwei cDNA-Sequenzen für HST, RAS und eine unbekannte HCT aus *Glechoma hederacea*. Die GhRAS-Sequenzen (EMBL accession number: HG423394, HG423395) kodierten für Proteine mit 398 und 432 AS. Das kürzere Protein ist bis auf eine interne Deletion von 36 AS dem langen Protein sehr ähnlich. Nach der Expression beider Proteine in *E. coli* zeigte nur das lange Protein die typische RAS-Aktivität. Die beiden GhHST-Sequenzen

(EMBL accession number: HG423392, HG423393) unterschieden sich in der Länge in nur vier AS und wiesen beide die typische Aktivität (Reaktion mit Shikimat) auf. Außerdem wurde noch eine unbekannte HCT gefunden, von welcher zwei ähnliche Sequenzen (EMBL accession number: HG423396, HG423397) isoliert wurden, die für Proteine mit 435 und 431 AS kodierten. Bis jetzt konnte die katalytische Aktivität dieser unbekannten HCT noch nicht bestimmt werden, aber weder Chinat, Shikimat noch pHPL wurden als Substrate akzeptiert (Sander 2010).

1.6 Auswirkungen von Ozon auf Pflanzen

1.6.1 Vorkommen von Ozon

Ozon (O_3) ist ein dreiatomiges Molekül (Abbildung 7), das in der Stratosphäre (15-50 km Höhe) die schädliche UV-Strahlung bei einer Wellenlänge von 200-315 nm abfängt, in der Troposphäre aber als Luftverschmutzer gilt und Menschen, Tieren und Pflanzen erheblichen Schaden zufügt (Kangasjärvi et al. 2005; Rowland 2006).



Abbildung 7: Mesomere Grenzstrukturen von Ozon

1785 entdeckte der holländische Chemiker Martinus van Marum bei der elektrischen Funkenentladung den Trisauerstoff durch den Geruch und stellte außerdem eine verstärkte Oxidation von Quecksilber fest (Sunnen 1988). Seinen prominenten Namen verdankt das Gas dem deutschen Chemiker Christian Friedrich Schönbein, Professor an der Universität zu Basel, der es 1840 auf Ozon (gr. "ὄζειν" (ozein) „riechen“) taufte (Sunnen 1988; Rubin 2001). Die korrekte chemische Zusammensetzung wurde 1865 von Jean-Louis Soret als Dioxid des Sauerstoffs bestimmt (Rubin 2001). Dobson entwickelte in den Anfängen des 20. Jahrhunderts ein Spektrometer mit diesem er das atmosphärische Ozon bestimmen konnte (Dobson 1968; Basher 1985). Der Meteorologe und Nobelpreisträger Crutzen beschrieb 1971 die katalytische Ozonvernichtung durch Stickoxide. Kurz darauf wurde die Rolle von Chloratomen aus FCKWs bei der Zerstörung der schützenden Ozonschicht bekannt; die 1987 durch das Montrealer Protokoll verboten wurden (http://ozone.unep.org/Assessment_Panels/SAP/Scientific_Assessment_2010/SAP-2010-FAQs-update.pdf).

Schon seit längerem gibt es bedenkliche Veröffentlichungen über ein Ansteigen des troposphärischen Ozons, welches 10% des Gesamt ozons ausmacht und einen enormen biologischen und ökologischen Einfluss aufweist (Allegrini et al. 1994; Lelieveld und Dentener 2000). Reaktionen auf dieses toxische Gas sind z.B. Ernteauffälle und reduziertes

Wachstum von Bäumen (Heck et al. 1982; Somers et al. 1998). Zwischen dem Ende des 19. Jahrhunderts und 1980 verdoppelten sich die Ozon-Hintergrundkonzentrationen in den mittleren Breitengraden der nördlichen Hemisphäre auf schätzungsweise $60\text{--}75\ \mu\text{g m}^{-3}$ (EEA 2010). Außerdem kursieren düstere Berichte über Überschreitungen des erlaubten Schwellenwerts von 40 ppb von >55% durch troposphärische Ozon-Hintergrundkonzentrationen im Jahr 2100 (Coyle et al. 2003; Wagg et al. 2013). Auch zahlreiche politische Strategien wie die "EU Ambient Air Quality Directive" (Richtlinie 2008/50/EC) oder das aktuelle Programm "Clean Air for Europe" (CAFE) der Europäischen Kommission, das sich zum Ziel gesetzt hat, bis 2020 eine Luftqualität zu erreichen, welche keine erheblichen negativen Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit und die Umwelt hat, konnten dies nicht verhindern (<http://ec.europa.eu/environment/air/quality/legislation/directive.htm>; <http://www.umweltbundesamt.de/luft/reinhaltestrategien/cafe.htm>). Die European Environment Agency (EEA) meldete im Jahr 2012 eine Überschreitung der „long-term objective“ (Fernziele, $120\ \mu\text{g O}_3/\text{m}^3$ pro Tag) an mehr als 150 Tagen in Spanien, Italien und Griechenland. Der AOT40-Index (accumulated concentration over a threshold of 40 ppb, Überschreitung der 40 ppb-Grenze) wird zurzeit zur Risikoabschätzung in Europa benutzt. Sowohl in Europa als auch in Nordamerika wurde beobachtet, dass die Spitzenkonzentrationen innerhalb eines Jahrzehnts um 30% zurückgingen, dennoch gibt es auch Beweise für einen Anstieg der Durchschnittskonzentrationen um 0,1 ppb/Jahr (Coyle et al. 2003).

Ozon wird durch folgende photochemische Reaktion gebildet: nachdem ein Sauerstoffmolekül (O_2 -Molekül) ein Photon (Lichtquant) von $< 430\ \text{nm}$ absorbiert hat, zerfällt es in zwei O_2 -Radikale. Ein Sauerstoffradikal kann mit einem O_2 -Molekül reagieren und Ozon bilden. Eine weitere Möglichkeit zur Bildung von Ozon ist die Spaltung von Stickstoffdioxid (NO_2) durch UV-Strahlung in Stickstoffmonoxid (NO) und ein Sauerstoffatom (siehe Abbildung 8). Der atomare Sauerstoff kann sich dann mit dem Luftsauerstoff zu O_3 verbinden, gleichzeitig baut NO das gebildete Ozon unter Bildung von NO_2 und O_2 wieder ab. Dies ist der Grund, warum das toxische Gas in Städten schneller abgebaut wird als auf dem Land (Krupa und Manning 1988).

Wenn Ozon in Wasser gelöst wird, bildet sich ein Hydroxylradikal, welches das höchste Oxidationspotenzial überhaupt aufweist und zur Desinfektion von Wasser in Schwimmbädern genutzt werden kann (Summerfelt und Hochheimer 1997). Das toxische Gas hat ein extrem hohes Oxidationspotenzial von 2,07 V (Iriti et al. 2003) und kann dadurch im tierischen und pflanzlichen Organismus theoretisch mit allen Makromolekülen (Lipiden, Proteinen, Nukleinsäuren, Zuckern) reagieren, obwohl es weder ein Radikal noch eine reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species = ROS) ist (Mustafa 1990; Kelly et al. 1995). Es kann zu Proteinmodifikationen kommen, ebenso können DNA-Schäden produziert werden (Mudd et al. 1969; Iriti und Faoro 2009). Dies wurde in Tieren anhand einer erhöhten Poly(ADP-Ribose)-Synthase-Aktivität gezeigt, da dieses Chromatin-gebundene Enzym für die Reparatur geschädigter DNA verantwortlich ist (Hussain et al. 1985).

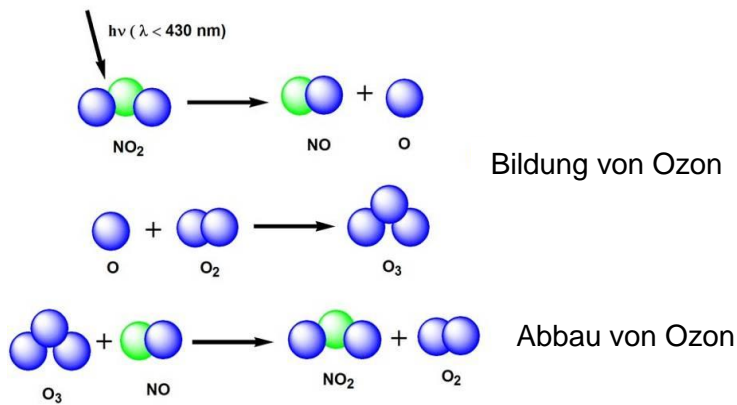


Abbildung 8: Bildung und Abbau von Ozon aus Präsentation: „Stress ossidativo e meccanismi di risposta nelle piante“, Prof. Dr. C. Nali

1.6.2 Auswirkungen von Ozon auf die Photosynthese

Pflanzen besitzen ein ambivalentes Verhalten zum Licht. Als oxygene, photoautotrophe Organismen benötigen sie dieses zum Leben, dennoch kann ein Zuviel zu einer Überproduktion der ROS führen. In Ausnahmesituationen bewirkt der photooxidative Schaden ein Ausbleichen der Pigmente und den Zelluntergang (Müller et al. 2001).

Kautsky und Hirsch machten 1931 die Entdeckung, dass Veränderungen in der Fluoreszenz durch Belichtung von dunkeladaptierten Blattfragmenten quantitativ mit Veränderungen der CO_2 -Assimilation korrelieren. Dadurch konnte die Vermutung bestätigt werden, dass unter bestimmten Voraussetzungen die Fluoreszenzemission mit der Photosyntheserate zusammenhängt (MacAlister und Myers 1940; Kautsky und Zedlitz 1941; Kautsky et al. 1960).

Butler entwickelte 1978 ein einfaches Modell für das Photosystem II (PSII), in dem die Photosynthese mit der Fluoreszenz und die Exitationsenergie durch Wärmeabstrahlung in den Pigmentantennen des PS II konkurriert. Der Elektronentransfer des Reaktionszentrums des PSII (P680) zu dem primären Chinonakzeptor des PSII (Plastochinon A, Q_A) bewirkt eine Fluoreszenzlöschung (photochemisches Quenching). Wenn mehr Energie als Wärme abgestrahlt wird, resultiert dies in einem nicht-photochemischen Quenching der Fluoreszenz. Die drei Prozesse Photosynthese, Chlorophyllfluoreszenz und Energieabgabe als Wärme stehen in direkter Konkurrenz zueinander. Wenn der Anteil eines Prozesses ansteigt, resultiert dies in der Abnahme der übrigen Parameter (siehe Abbildung 9, Baker 2008).

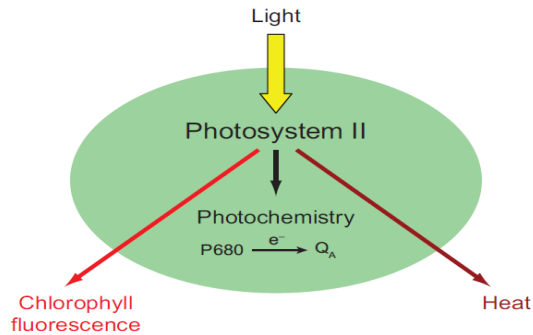


Abbildung 9: Modell des Photosystems II aus Baker 2008

Die Absorption des Sonnenlichts erfolgt durch den Lichtsammelkomplex (light-harvesting pigment-protein complex = LHC), der mit den Reaktionszentren (P680, P700) verbunden ist. Durch die Absorption von Licht wird ein Chlorophyllmolekül von dem Grundzustand in den Singulettzustand ($^1\text{Chl}^*$) versetzt. Von dort gibt es verschiedene Möglichkeiten, zum Grundzustand zurückzukehren (siehe Abbildung 10). Es kann durch Lichtabgabe, welche als Fluoreszenz sichtbar ist, relaxieren (1). Weitere Möglichkeiten sind das Ausführen von Photosynthese durch Übertragung der Energie zu den Reaktionszentren (photochemistry, (2)) oder die Energieabgabe durch Wärme (3). Reaktionen (2) und (3) mindern die Fluoreszenz, werden somit als Löscher („Quencher“) bezeichnet. Möglich ist außerdem die Umwandlung des Chlorophylls aus dem Singulettzustand in den Triplettzustand (4). Obwohl dieser Triplettweg ein ausgezeichnetes Ventil für Exzitationsenergie sein kann (Foyer und Harbinson 1999), vermag jedoch das $^3\text{Chl}^*$ seine Energie ebenso an das Sauerstoffmolekül abzugeben und dadurch Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2^*$) zu generieren. Dieser ist ein äußerst reaktiver Vertreter der ROS (Müller et al. 2001).

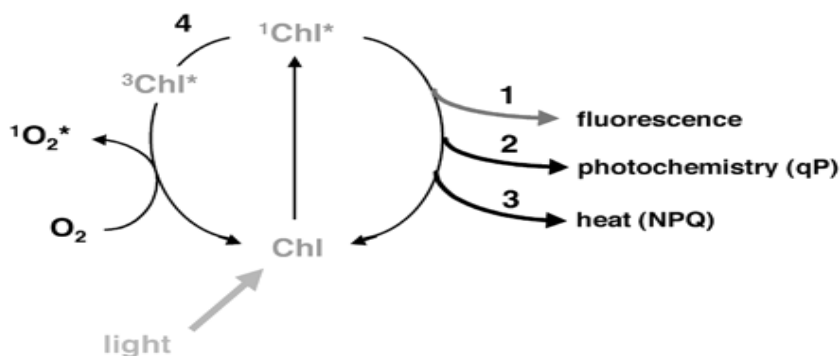


Abbildung 10: Mögliche Zustände von angeregtem Chlorophyll aus Müller et al. 2001

Ozon bewirkt ernsthafte Schädigungen der Pflanze. Zum Beispiel wird das Wachstum gehemmt, es kommt zu Ressourcenumlagerung und sichtbaren Verletzungen, außerdem kann der Phänotyp der Pflanzen verändert werden (Ainsworth et al. 2012). Wie Pflanzen auf oxidativen Stress reagieren, hängt von der Ozondosis ab (Konzentration, Expositionsdauer). Die Auswirkungen sind außerdem von der Aufnahme und der Effizienz der Abwehrmechanismen abhängig (Heath 2008). Als eine der ersten Reaktionen der Pflanze gilt das Schließen der Spaltöffnungen, um ein weiteres Eindringen des toxischen Gases zu ver-

meiden (Novak et al. 2005; Hoshika et al. 2013). Die Reduktion in der Photosyntheserate könnte durch ein Schließen der Stomata und einen verminderten Elektronentransport, ebenso wie eine reduzierte Carboxylierungskapazität und eine Verminderung der Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (RuBisCO, E.C. 4.1.1.39) erklärt werden (Reich 1983; Paoletti et al. 2009). Außerdem werden die photosynthetisch aktive Strahlung (photosynthetically active radiation, PAR) sowie das Luftdampfdruckdefizit (air vapour pressure deficit, VPD) stark von Ozon beeinflusst. Makroskopisch sichtbar sind rotbraune Flecken (Akkumulation von Phenylpropanoiden) und außerdem bleiche Stellen (Bergmann et al. 1999; Krupa et al. 2000).

1.6.2.1. Beeinflussung des Xanthophyllzyklus

Carotinoide können in allen photosynthetisch aktiven Organismen gefunden werden. Diese Molekülklasse enthält die β -Carotine und die Xanthophylle, welche noch zusätzlich sauerstoffhaltige Gruppen in ihren terminalen Ringen tragen. Carotinoide sind Tetraterpene (C_{40} , von 8 Isopreneinheiten abgeleitet) und somit Produkte des Methylerythritolphosphat-Wegs, welcher in den Chloroplasten lokalisiert ist (Buchanan 2000).

Alle aeroben photosynthetisch aktiven Organismen können Zeaxanthin durch eine Deepoxidierung des Diepoxids Violaxanthin durch die Violaxanthin-De-Epoxidase über die Zwischenstufe des Monoepoxids Antheraxanthin bilden (Hager 1969; Yamamoto und Bassi 1996) (siehe Abbildung 11). Zeaxanthin schützt den Photosyntheseapparat vor photooxidativen Schäden durch „Quenching“ des Chlorophylls im Triplettzustand. Außerdem vermag es, die Thylakoidmembranen bei hohen Temperaturen zu stabilisieren (Havaux et al. 2007). Die photoprotektive Rolle des Xanthophyllzyklus wurde genau untersucht (Demmig et al. 1987; Demmig-Adams und Adams 1996). Ein pH-Abfall im Lumen der Thylakoide induziert die chemische Umwandlung von Violaxanthin zu Zeaxanthin, und dieses vermittelt die Abgabe überschüssiger Energie als Hitze (Yamamoto 1979; Hager 1980; Demmig-Adams und Adams 1996).

Einige Autoren zeigten, dass Carotinoide (Lutein, Zeaxanthin) durch nicht-photochemisches Quenching der Chlorophyllfluoreszenz eine zentrale Rolle in der oxidativen Stressantwort von Pflanzen spielen (Casper-Lindley und Björkman 1998; Bungard et al. 1999).

Einleitung

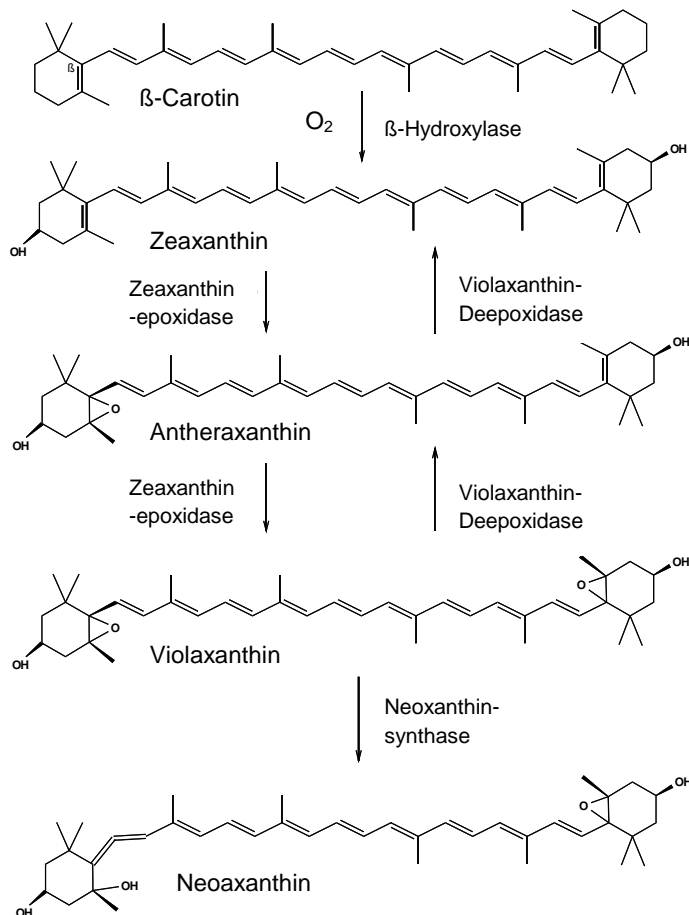


Abbildung 11: Xanthophyllzyklus

1.6.3 Auswirkungen von Ozon auf den Sekundärstoffwechsel

Der deutsche Botaniker Ernst Stahl konnte 1888 zeigen, dass pflanzliche Sekundärstoffe der Abwehr dienen. Er postulierte, dass der hohe Gerbstoffgehalt zahlreicher Eichenarten insbesondere der Insektenabwehr diene.

Viele Sekundärstoffe, die sich konstitutiv in einer Pflanzenart oder einem bestimmten Pflanzenorgan befinden, können aber auch in einer anderen Art oder in einem anderen Organ der gleichen Art durch diverse Stressoren induziert werden (Beggs et al. 1987; Christie et al. 1994; Baher et al. 2002). Sekundärmetabolite können zwar innerhalb der Mitglieder einer Art sehr ähnlich sein, sind aber trotzdem in hohem Maße von der geographischen Lage, von Umweltbedingungen (Vokou et al. 1993; Slavkovska et al. 1997) oder dem Zustand der Pflanze abhängig (Amiri 2007).

In Pflanzen macht die chemische Diversität den evolutionären Erfolg aus. Da sie sich nicht vom Fleck bewegen können, können sie den abiotischen und biotischen Stressoren nicht ausweichen und müssen sich anders „verteidigen“. Aus diesem Grund haben sie sich, anders als Tiere, eine enorme Bandbreite an Abwehrmechanismen zugelegt (Iriti und Faoro 2009).

Nach einer Stressexposition kommt es binnen kurzer Zeit zu einer Transkriptionsaktivierung der Gene von Schlüsselenzymen und zur Akkumulation von Sekundärmetaboliten, um einerseits die Resistenz zu erhöhen und andererseits die Toleranzschwelle gegenüber Pathogenen anzuheben (Booker und Miller 1998; Iriti und Faoro 2009; He et al. 2012; Oliveira et al. 2013). Die Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL) ist ein extrem sensibler Indikator für Stressreaktionen und kann als biochemischer Marker angesehen werden, da sie einen Ausgangspunkt für die Synthese von strukturellen Komponenten darstellt (siehe Abbildung 12). In *Arabidopsis thaliana* wurde die PAL-mRNA umgehend nach Ozonbegasung (300 ppb, 6 h) induziert und erreichte ein dreifach höheres Level als in den Kontrollpflanzen (Sharma und Davis 1994). Auch in der Petersilie (*Petroselinum crispum*) konnten ein Anstieg auf das Dreifache an spezifischer PAL-Aktivität sowie ein Anstieg auf das Doppelte der Furanocumarine und Flavonglycoside in Blättern beobachtet werden (Eckey-Kaltenbach et al. 1994). Es ist davon auszugehen, dass Ozon zwei voneinander verschiedene Signalwege als Schutzantwort auf Ozon beeinflusst: den Salicylsäure (SS)-abhängigen Weg und den SS-unabhängigen Weg (Langebartels et al. 1991). In *Phaseolus vulgaris* bewirkte Ozon eine Stimulierung des Phenylpropanoidwegs und des Flavonoidwegs, was durch eine erhöhte mRNA-Produktion von PAL, Chalkonsynthase und Chalkonisomerase gezeigt werden konnte (Paolacci et al. 2001). Shikimat Dehydrogenase (SKDH), ein Schlüsselenzym des Shikimatwegs, PAL und Cinnamoylalkohol Dehydrogenase (CAD), ein Schlüsselenzym der Ligninbiosynthese wurden in *Populus tremula x alba*-Blättern nach Ozonbegasung untersucht. Nach 60-120 nI/l Ozonbegasung über einen Monat wurden sowohl die CAD-Aktivität als auch die CAD-mRNA-Transkriptionslevel stark induziert. Dazu standen im extremen Gegensatz die PAL- und SKDH-Aktivitäten, welche nur in alten und mittelalten, aber nicht in jungen Blättern, anstiegen. Dies ist durch den unterschiedlichen Ligningehalt der alten und jungen Blätter erklärbar (Cabané et al. 2004). Zusammenfassend ist zu sagen, dass der Phenylpropanoidweg stark durch Ozon beeinflusst wird, um z.B. eine erhöhte Ligninsynthese zu forcieren. Durch die verstärkte Ligninsynthese oder die strukturelle Modifikation kann das Plasmalemma vor ROS-Verletzungen geschützt werden. Außerdem werden die Membranen vor Schäden durch Lipidperoxidation geschützt (Iriti und Faoro 2004).

Einleitung

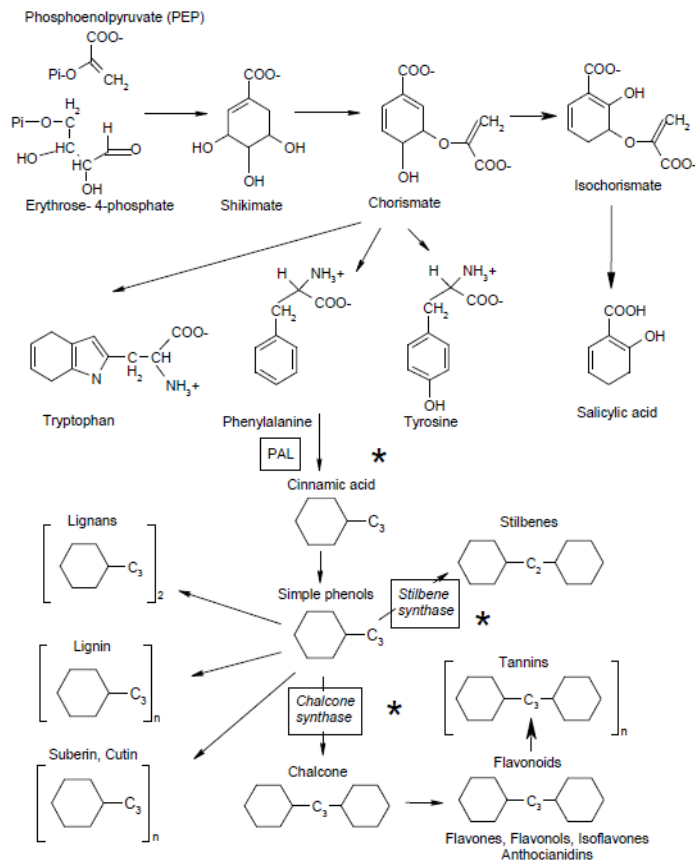


Abbildung 12: Biosynthese von Phenylpropanoiden, geänderte Abbildung aus Iriti und Faoro 2009

1.6.4 Antioxidative Mechanismen in Pflanzen

Antioxidans ist ein Begriff, der häufig benutzt wird, aber kaum definiert ist. Oftmals ist dieser Begriff auf Inhibitoren der Lipidperoxidation wie α -Tocopherol begrenzt. Dennoch haben besonders freie Radikale die Kapazität, Proteine und DNA zu schädigen. Aus diesem Grund wurde der Begriff umfassender definiert: Ein Antioxidans ist jede Substanz, die, wenn sie in geringen Konzentrationen vorhanden ist, signifikant die Oxidation eines Substrats verzögert oder verhindert (Halliwell 1996).

Innerhalb der pflanzlichen Zelle werden ROS in Chloroplasten, Mitochondrien und Peroxisomen gebildet (Jiménez et al. 1997). Als Vorläufer („precursor“) fungiert singulärer Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), welcher durch Aufnahme von einem, zwei oder drei Elektronen die Bildung von z.B. Superoxidradikalen ($\text{O}_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikalen (HO^{\cdot}) anregt (Mittler 2002). In biologischen Systemen nehmen Metallionen (Fe^{2+} , Cu^+) und Semichinone die Stellung von Elektronendonatoren ein. Sowohl das Superoxidradikal als auch das Hydroperoxylradikal (HO_2^{\cdot}) bewirken eine spontane Dismutation und produzieren Wasserstoffperoxid (Blokhina et al. 2003). ROS werden in der Pflanze bei bestimmten Redoxreaktionen, bei einer unvollständigen Sauerstoffreduktion, bei der Wasseroxidation durch die Mitochondrien oder durch die Elektronentransferketten in den Chloroplasten ge-

bildet. Es ist seit langem bekannt, dass ROS diverse Rollen bei der Lignifizierung und Pathogenese spielen. Durch ihre Bildung kann die Ausbreitung von Pathogenen durch Verdickungen der Pflanzenzellwände oder durch eine direkte Zerstörung der Pathogene gehemmt werden. Außerdem können sie als Signalmoleküle bei der lokalen und systemischen Resistenz dienen (Buchanan et al. 2000; Dat et al. 2000). Unter normalen Wachstumsbedingungen ist die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in Zellen relativ gering ($240 \mu\text{M s}^{-1} \text{O}_2^{\cdot-}$ und ein gleichförmiges Level von $0,5 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ in Chloroplasten). Viele Stressoren, welche die zelluläre Homöostase von Zellen stören, verstärken die Produktion von ROS ($240\text{-}720 \mu\text{M s}^{-1} \text{O}_2^{\cdot-}$ und ein Level von $5\text{-}15 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$). Diese beinhalten Trockenstress, Salzstress, Kälte, Hitze, Schwermetalle, UV-Strahlung, Luftverschmutzungen wie Ozon oder Schwefeldioxid, mechanischen Stress, Mangelversorgung mit Nährstoffen oder Pathogenbefall. Außerdem konnte gezeigt werden, dass ein Befall mit Pathogenen, Verwundung oder Umweltbelastungen (Trockenheit oder osmotischer Stress) die Bildung von ROS durch NADPH-Oxidasen begünstigen (Mittler 2002).

Ozon findet seinen Eingang in die Pflanze über Stomata in der Epidermis, da das polare und hydrophile Molekül die Kutikula nicht durchdringen kann (siehe Abbildung 13; Buchanan et al. 2000). Eine der ersten Abwehrreaktionen der Pflanze ist das Schließen der Stomata, welches durch das Plasmamembranprotein SLAC1 (slow anion channel-associated 1) reguliert wird (Vahisalu et al. 2008). Nach dem Passieren der Stomata befinden sich die Ozonmoleküle im apoplastischen Raum und reagieren dort mit Ethylen und anderen Alkenen, was zu einer Bildung von OH^{\cdot} , $\text{O}_2^{\cdot-}$ und H_2O_2 führt (Buchanan et al. 2000). In der Zellmembran repräsentieren polyungesättigte Fettsäuren das primäre Angriffsziel des starken Oxidationsmittels (Normalpotenzial: $+2,07 \text{ V}$), dadurch resultieren Lipidperoxidationen. Diese beeinflussen dadurch die Membranfluidität und ein Entweichen von Elektrolyten (Pryor und Church 1991; Soldatini et al. 1998; Iriti et al. 2003; Iriti und Faoro 2009). Durch die Membranschäden können weitere Ozonmoleküle in das Zytoplasma gelangen. Ein ozonstimulierter Schaden an der Plasmamembran hemmt die Protonenpumpen, bewirkt einen Kollaps des Membranpotenzials und erhöht die Calciumaufnahme aus dem Apoplasma durch kovalente Modifizierung der Calciumkanäle in der Plasmamembran (Baier et al. 2005). Wenn das Ozon innerhalb der Zelle zu einer erhöhten Anzahl an ROS und zerstörten Biomolekülen führt, wird das antioxidative System angeregt. Aus diesem Grund können ROS als zelluläre Stressindikatoren, aber auch als Sekundärmediatoren, welche in Signaltransduktionswegen in der Stressantwort involviert sind, angesehen werden. Des Weiteren können erhöhte Level an ROS einen PCD-Signalweg („programmed cell death“, programmierter Zelltod) induzieren, was durch eine oxidative Stresshemmung bei durch Paraquat-induziertem Zelltod nachgewiesen wurde (Mitsuhara et al. 1999). Die verstärkte Produktion von ROS während einer Stressantwort kann den programmierten Zelltod bedeuten, sie können aber auch als Signalmoleküle für Abwehrmechanismen dienen. Der durch ROS induzierte Zelltod kann durch oxidative Prozesse, wie Lipidperoxidation von Membranen, Proteinoxidation, Enzymhemmung und Schäden an DNA und RNA ausgelöst werden (Buchanan 2000; Mittler 2002).

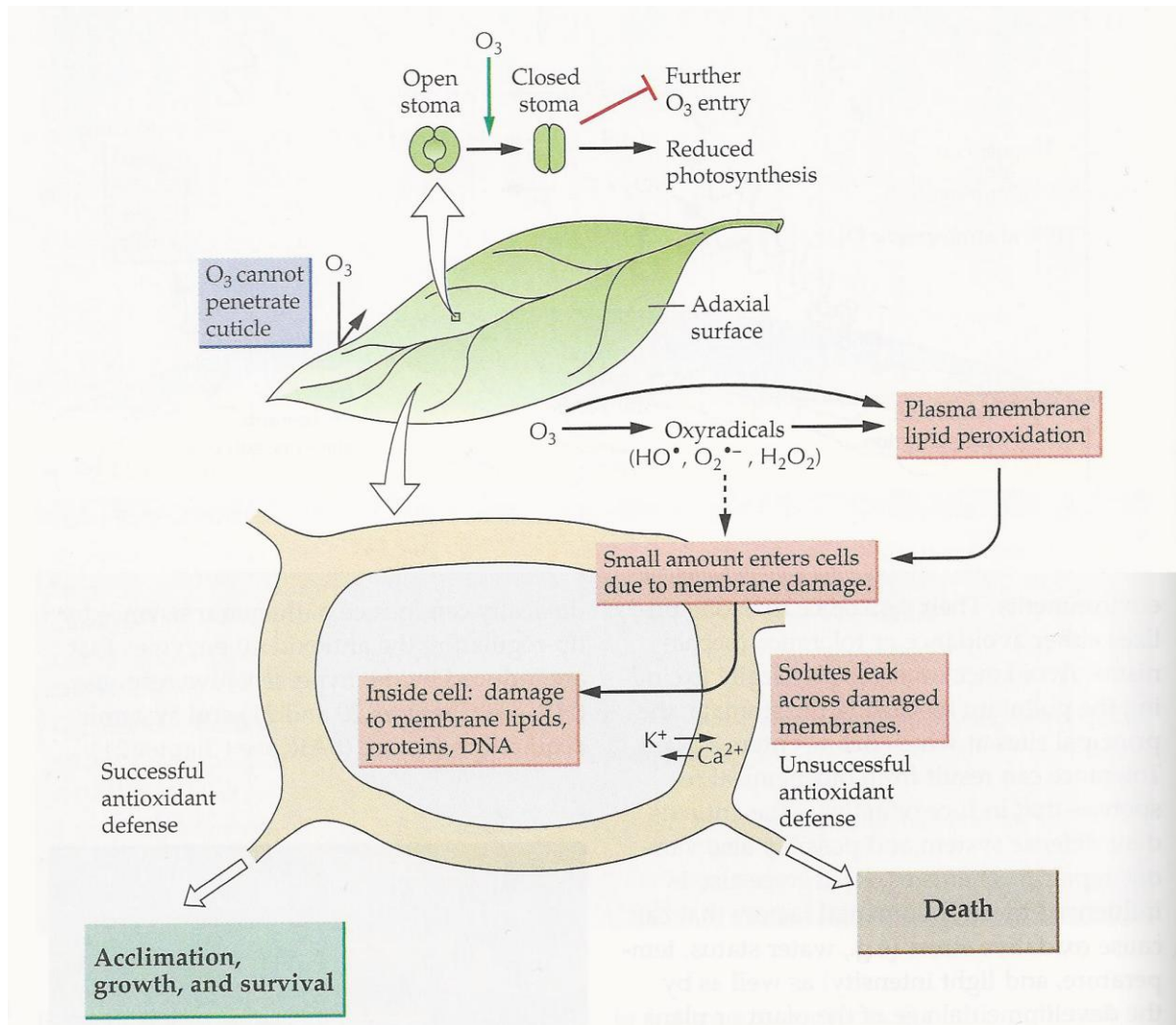


Abbildung 13: Ozonschäden und resultierende Reaktionen in der Pflanze aus Buchanan et al. 2000

Das Superoxidradikalanion ($O_2^{\bullet-}$) entsteht u.a. durch die Reduktion von molekularem Sauerstoff (Sutherland 1991). Es wird in aeroben Zellen kontinuierlich z.B. in Elektronentransportsystemen in geringen Konzentrationen gebildet (Loschen et al. 1974). Durch die Superoxiddismutase wird das Superoxidradikal entgiftet und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) gebildet (Fridovich 1986). H_2O_2 und $O_2^{\bullet-}$ sind zwar innerhalb der ROS weniger reaktiv, aber trotzdem genauso gefährlich, da sie in jedes Zellkompartiment diffundieren können (Di Baccio et al. 2008).

Wasserstoffperoxid kann seinerseits durch die Katalase (EC 1.11.1.6) und die Peroxidase (EC 1.11.1.7), welche in nahezu allen Kompartimenten der pflanzlichen Zelle enthalten ist, zu Wasser gespalten werden. Allerdings ist der Schutz durch die Katalase durch eine geringe Substratspezifität und eine mögliche lichtinduzierte Inaktivierung relativ gering ausgeprägt. In Pflanzen existiert jedoch ein weiterer und durchaus effektiver Entgiftungsmechanismus im Kampf gegen Wasserstoffperoxid, welcher in den Chloroplasten und im Zytosol lokalisiert ist: der Ascorbat-Glutathion-Zyklus, welcher auch als Halliwell-Asada-Weg bezeichnet wird (Zhang und Kirkham 1996; siehe Abbildung 14). Wenn H_2O_2 nicht durch die Ascorbatperoxidase entgiftet wird, kann dieses Hydroxylradikale bilden. Diese Reaktion

findet häufig mit reduzierten eisenhaltigen Komponenten statt und wird als Fenton- oder Haber-Weiss-Reaktion bezeichnet (Jakob und Heber 1996; Blokhina et al. 2003).

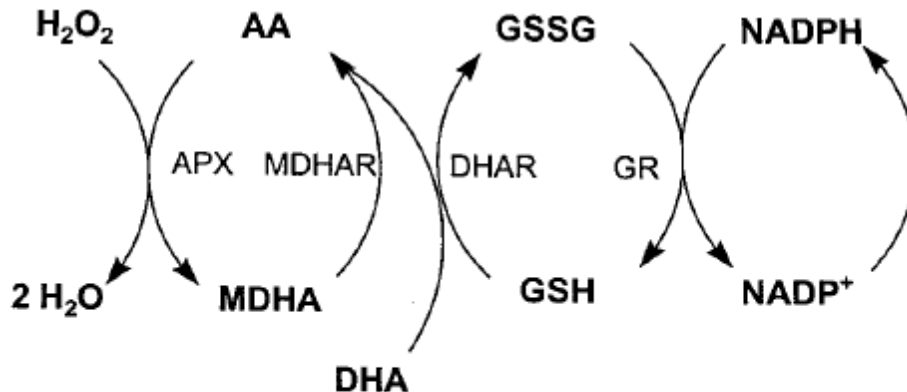


Abbildung 14: Ascorbat-Glutathion-Zyklus, AA: Ascorbinsäure (reduzierte Form), MDHA: Monodehydroascorbat, DHA: Dehydroascorbat, APX: Ascorbatperoxidase (EC 1.11.1.11), MDHAR: Monodehydroascorbatreduktase (EC 1.6.5.4), GSH: Glutathion (reduziert), GSSG: Glutathion (oxidiert), DHAR: Dehydroascorbat Reduktase (EC 1.8.5.1) GR: Glutathionreduktase (EC 1.6.4.2) aus May et al. 1998

Dehydroascorbat (DHA) wird durch Ascorbinsäure in pflanzlichen oder tierischen Zellen durch eine Übertragung von einem oder zwei Elektronen (Oxidation) generiert (Wells und Xu 1994, siehe Abbildung 15). Während des Oxidationsschrittes von Ascorbat (AsA) formiert sich ein intermediär gebildetes Radikal mit geringer Reaktivität. Diese geringe Reaktivität mag der Grund für die antioxidativen Eigenschaften der Ascorbinsäure sein: ein sehr reaktives Radikal reagiert mit Ascorbat und ein viel weniger reaktives Radikal (Ascorbatradikal) wird gebildet, welches weder stark oxidierend noch reduzierend ist. Ascorbat dient wahrscheinlich auch als schützendes Agens bei Schäden, welche durch ROS hervorgerufen werden. Ascorbathaltige Lösungen, die im Respirationstrakt angewendet werden, könnten einen Schutz vor eingeatmeten schädlichen Agenzien, wie Ozon oder NO₂^{*}, bieten (Halliwell 1996).

Reduziertes Ascorbat fungiert wie Phenole und Prolin als kleinmolekulare Verbindung (Pasqualini et al. 2003; El-Khatib 2003; Di Baccio et al. 2008) in der Ozonabwehr.

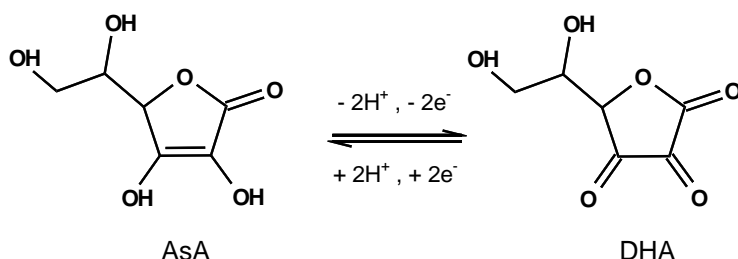


Abbildung 15: Ascorbat (AsA, reduziert, links) und das Oxidationsprodukt Dehydroascorbat (DHA, rechts)

1.7 Zielsetzung

Projekt 1: Charakterisierung der Rosmarinsäuresynthase (RAS) aus *Coleus blumei* und deren Kristallisation

Da bisher die heterolog in *E. coli* exprimierte Rosmarinsäuresynthase in löslicher Form nicht in adäquater Quantität gewonnen werden konnte, wird jenes Ziel in diesem Projekt verfolgt. Des Weiteren stehen Kristallisationsversuche an, in denen die Kristallstruktur der Rosmarinsäuresynthase mithilfe von Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden soll.

Projekt 2: Charakterisierung von Chimären aus RAS und HST

In der Molekularbiologie können Teilstücke von Proteinen ausgetauscht und deren Enzymaktivität bestimmt werden. Die RAS aus *Coleus blumei* ist eine Hydroxycinnamoyl-CoA:Hydroxyphenyllactat Hydroxycinnamoyltransferase. Durch Konstruktion einer Chimäre mit der Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat Hydroxycinnamoyl-transferase (HST) können Rückschlüsse auf die beteiligten Aminosäuren bei der Substratbindung oder bei der Katalyse gezogen werden. Ausgangspunkt für die Konstruktion der Chimären sind die isolierten Expressionsplasmide pET-15b-CbRAS und pET-15b-CbHST.

Projekt 3: Charakterisierung von Hydroxycinnamoyltransferasen

Zu den wichtigsten Hydroxycinnamoyltransferasen gehören die Hydroxycinnamoyl-CoA:Hydroxyphenyllactat Hydroxycinnamoyltransferase (RAS), die Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat Hydroxycinnamoyltransferase (HST) und die Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinat Hydroxycinnamoyltransferase (HQT). Es ist Ziel dieser Arbeit, diese Hydroxycinnamoyltransferasen aus *Glechoma hederacea* (efeublättriger Gundermann, Gundelrebe) zu klonieren und zu charakterisieren.

Projekt 4: Einfluss von Ozon auf *Melissa officinalis*

Obwohl die Ozonspitzenkonzentrationen in den letzten Jahrzehnten drastisch zurückgegangen sind, sind die Hintergrundkonzentrationen immer noch um ca. 55% über dem Schwellenwert von 40 ppb erhöht. Zitronenmelisse (*Melissa officinalis*) ist eine häufig verwendete Arzneipflanze, die zur Familie der Lamiaceae (Unterfamilie: Nepetoideae) gehört.

Die Melissenpflanzen werden kurzzeitig mit Ozon begast und Proben zu verschiedenen Zeitpunkten genommen. Es werden Änderungen der photosynthetischen Funktionen bestimmt. Außerdem werden ökophysiologische, biochemische und antioxidative Parameter untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Versuche zur Gewinnung von Proteinkristallen der RAS aus *Coleus blumei*

2.1.1 *E. coli*-Wirtsstämme

Mit dem chemisch kompetenten Stamm *E. coli* BL21(DE3)pLysS kann hocheffizient eine rekombinante Proteinexpression jedes Gens erzielt werden, das unter der Kontrolle des T7-Promoters liegt. Da ein Mangel an den Proteasen Lon und OmpT vorliegt, erhöht sich die Stabilität des Zielproteins. Dieser Wirtsstamm ist lysogen für den Phagen λ (DE3) und enthält das T7-Bakteriophagen I, welches unter der Kontrolle des lac-UV5 Promotors die T7-RNA-Polymerase kodiert (Studier und Moffatt 1986). Außerdem enthält er ein Plasmid (pLysS) mit Chloramphenicolresistenz, welches für das T7-Lysozym kodiert. Jenes Lysozym verringert die Basalexpression der Zielgene, die unter der Kontrolle des T7-Promoters stehen, interferiert aber nicht mit dem Expressionslevel, welches durch die Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG)-Induktion hervorgerufen wird. Außerdem erhöht es die Toleranz der *E. coli*-Zellen gegenüber toxischen Proteinen (Moffatt und Studier 1987). Ein weiterer Vorteil des Lysozyms ist der leichtere Zerfall der Zelle bei einem Aufschluss durch Ultraschall. Mithilfe des chemisch kompetenten Stamms *E. coli* BL21(DE3)pLysS wurden erste Versuche zur Expression des rekombinanten CbRAS-Proteins durchgeführt.

Da die RAS hauptsächlich aufgrund der schlechten Löslichkeit in inclusion bodies vorliegt (Sander 2010), wurde versucht, durch Verwendung der chemisch kompetenten SoluBL21TM *E. coli*-Zellen die Löslichkeit der RAS zu erhöhen. Es wurde ein Expressionssystem verwendet (DE3), welches die T7-RNA-Polymerase benutzt, um die Genexpression zu regulieren, die unter der Kontrolle des T7-Promoters steht. Die T7-Expressionsvektoren benötigen lysogene *E. coli* Stämme, welche die T7-RNA-Polymerase nach Induktion mit IPTG exprimieren. Die OmpT ist eine homologe Membranprotease (OmpTine), die für die Virulenz von *E. coli* verantwortlich ist. Durch eine spezifische Mutation ompT wird eine mangelhafte OmpT produziert, was wiederum in intakten rekombinanten Proteinen resultiert. Durch einen speziell mutierten Stamm „hsd (host specificity for DNA) SB (rB⁻mB⁻)“ kann die Transformationseffizienz signifikant gesteigert werden. Aufgrund spezifischer Selektionskriterien besitzt der SoluBL21TM-Stamm uncharakteristische Mutationen, wodurch er sonst unlösliches Protein in vollständig oder teilweise löslicher Form exprimieren kann (SoluBL21TM Competent *E. coli*, Amsbio).

2.1.2 pET-Vektoren

Das pET-Vektorsystem ist eines der stärksten Systeme für die Klonierung und Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*. Es existieren zwei verschiedene Kategorien: Transkriptions- und Translationsvektoren. Transkriptionsvektoren wurden für die Expression von Zielgenen entwickelt, welche schon ihre eigene prokaryotische Ribosomenbindungsstelle und ein AUG Startcodon aufweisen, z.B. pET-21(+), pET-24(+) und pET-23(+). Die diversen Translationsvektoren enthalten die hocheffiziente Ribosomenbindestelle des „major capsid

protein“ des T7-Phagen, z.B. pET-33b(+), pET-22b(+), pET-3a-d. Der Translationsvektor pET-15b besitzt einen T7-lac-Promoter, weist einen 6xHis-tag zu Aufreinigungszwecken auf, besitzt drei Klonierungsschnittstellen (*Bam*HI, *Xho*I und *Nde*I) und verfügt über die Selektionsmöglichkeiten Ampicillin und Kanamycin (Novagen® pET System Manual).

2.1.3 Expression des CbRAS-Proteins in *E. coli* BL21(DE3)pLysS

Um geeignete Kristallisationsbedingungen zu finden, sollte das Protein in überexprimierter Form vorliegen, da man dadurch große Mengen hochreines Protein erzielen kann. Das stark aufkonzentrierte, gereinigte Protein wurde in Kristallisationsplatten mit speziellen Pufferlösungen, welche meist hohe Konzentrationen an Salzen oder Alkoholen enthalten, vermischt und durch Dampfdiffusion präzipitiert.

Durch die Ligation der CbRAS-Volllängen(VL)-Sequenz (rosmarinic acid synthase, Rosmarinsäuresynthase aus *Coleus blumei*) 4/1 in den Vektor pET-15b, mit dem der Wirtstamm *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformiert wurde, war die Voraussetzung für die heterologe Expression des CbRAS-Proteins geschaffen (Berger et al. 2006). Durch N-terminales Anhängen eines 6xHis-tags konnte das Protein aus dem bakteriellen Rohextrakt aufgereinigt werden. Die spezifische Aktivität dieses aufgereinigten Proteins lag zwischen 10 und 30 mkat/kg (Berger et al. 2006).

Die Gewinnung des rekombinanten CbRAS-Proteins wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Es wurden vier 500 ml EMK (Erlenmeyerkolben) mit jeweils 250 ml „lysogeny broth“ (LB, siehe 4.2.1)-Ampicillin-Medium (100 µg Ampicillin pro ml Medium) mit 1 ml Übernachtskultur der gewünschten Bakterien (ÜN-Kultur) versetzt. Dieser Ansatz wurde bei 220 UpM (Umdrehungen pro Minute) und 25 °C für 25 h inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren der Bakterien bei 4 °C, 3000 g für 5 min und dem Abgießen mit anschließendem Abheben des Überstands wurden die Pellets nach Bestimmung des Gewichts und Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert.

Nach dem langsamen Auftauen auf Eis erfolgte der Aufschluss der Pellets zu Rohextrakten:

Jedes der ca. 375 mg schweren Pellets wurde in der vierfachen Menge His-tag-Bindepuffer (BP) resuspendiert und mittels Ultraschall für 1 min aufgeschlossen. Da bei 0,3 Zyklen und 100% die Temperatur stark anstieg und dies zu einer Denaturierung der Enzyme führen könnte, war auf ein gleichzeitiges Kühlen mit Eis zu achten. Je zwei Homogenate wurden vereinigt, der Rohextrakt wurde bei 4 °C und 5000 g für 10 min abzentrifugiert (1. Aufschluss).

Die Pellets wurden in je 1,5 ml His-tag-BP resuspendiert, mit Ultraschall, wie oben, aufgeschlossen, zentrifugiert und der Überstand wurde zum Rohextrakt gegeben (2. Aufschluss). Dieses Prozedere wurde noch viermal wiederholt. Der gesammelte Rohextrakt betrug 18 ml.

| |
|--|
| His-tag-Bindepuffer (BP): |
| 50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 -Puffer pH 8,0 |
| 300 mM Natriumchlorid |
| 10 mM Imidazol |

| |
|---|
| Ampicillin-Stammlösung (20 mg/ml): |
| 300 mg Ampicillin |
| ad 15 ml Aqua dest. |
| Es wurden 300 mg Ampicillin mittels Magnetprüher in etwas destilliertem Wasser gelöst und auf 15 ml aufgefüllt. Unter der Sterilbank wurde die Lösung durch einen 0,22 µm Rotilabo® Spritzenfilter (Roth, Karlsruhe) sterilfiltriert, à 750 µl aliquotiert und bei -20 °C gelagert. |

Übernacht (ÜN)-Kulturen:

In autoklavierten Kulturröhrchen wurden jeweils 4 ml LB-Medium mit 20 µl Ampicillin-Stammlösung (20 mg/ml) vorgelegt. Mit einem sterilen Zahnstocher wurden aus einer Bakterien-dauerkultur oder von einer Agarplatte Bakterien gepickt und in das LB-Amp-Medium über-führt. Bei 37 °C und 220 UpM wurde über Nacht schüttelnd inkubiert. Aus der Bak-teriensuspension konnten wieder Dauerkulturen hergestellt werden, sie konnten zum An-impfen einer Bakterienkultur sowie für eine Plasmidpräparation (siehe Kapitel 2.1.4) oder weitere molekularbiologische Analysen benutzt werden.

2.1.4 Präparation von Plasmid-DNA (Minipräparation)

Die Aufreinigung ist für maximal 20 µg Plasmid-DNA aus 1-5 ml ÜN-Kultur von *E. coli* in LB-Medium konzipiert.

Das QIAprep® Spin Miniprep Verfahren der Firma Qiagen verwendet die modifizierte alkalische Lyse der Bakterienzellen nach Birnboim und Doly (1979). Die Bakterienzellen werden unter alkalischen Bedingungen lysiert. Anschließend wird das Lysat neutralisiert und auf die salzhaltigen Bedingungen eingestellt. Im Anschluss erfolgen die Adsorption der DNA an eine Silikatmembran, zwei Waschschrirte und die Elution der Plasmid-DNA.

1,5 ml der ÜN-Kultur wurden in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt und bei Raum-temperatur sedimentiert (3000 g, 5 min). Der Überstand wurde verworfen und das gleiche Prozedere noch einmal durchgeführt. Das aus zwei Zentrifugationsschrirten erhaltene Bakte-rienpellet wurde in 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Anschließend gab man 250 µl Puffer P2

dazu und mischte durch sechsmaliges Invertieren. Die Lyse zeigte sich durch die dickflüssige, weißliche Konsistenz und durfte nicht länger als 5 min andauern. Nach der Zugabe von 350 µl Puffer N3 musste sofort durch sechsmaliges Umschütteln gemischt werden, um eine lokale Präzipitation zu vermeiden. Um eine Trennung zu erreichen, wurde 10 min bei 16000 g zentrifugiert. Der Überstand (ca. 800 µl) wurde auf ein QIAprep Säulchen überführt und für 60 s bei 16000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Um die am Säulenmaterial adsorbierte DNA zu waschen, wurden 0,5 ml Puffer PB auf das Säulchen pipettiert und erneut für 60 s bei 16000 g zentrifugiert. Es folgten ein weiterer Waschschriff mit 0,75 ml Puffer PE und anschließend eine einminütige Zentrifugation. Um eventuell noch vorhandenes Ethanol zu entfernen, wurde erneut für 60 s bei 16000 g zentrifugiert.

Zur Elution der Plasmid-DNA gab man 50 µl autoklaviertes Wasser auf die Säule und inkubierte für 1-5 min. Dann wurde das Säulchen in ein autoklaviertes Eppendorfgefäß gesetzt und für 1 min zentrifugiert. Die Plasmid-DNA befand sich nun im Eluat. Zum Entfernen noch vorhandener DNA-Reste gab man 500 µl autoklaviertes Wasser auf die Säule und zentrifugierte erneut, um das gereinigte Säulchen nochmals verwenden zu können. Das Plasmid konnte für Sequenzuntersuchungen oder für weitere molekularbiologische Analysen verwendet werden.

2.1.5 Restriktionsverdau der isolierten Plasmid-DNA

Um den Einbau eines DNA-Stücks in ein Plasmid zu kontrollieren, wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Restriktionsenzyme (RE) sind Restriktionsendonukleasen, die Phosphodiesterbindungen zwischen Nukleotiden spalten. Die Nomenklatur der Restriktionsenzyme wurde 1973 von Smith und Nathans eingeführt. Die ersten drei Buchstaben bestehen aus dem Anfangsbuchstaben der Gattung und den ersten beiden Buchstaben des Epithetons des Bakteriums, aus dem das Enzym isoliert wurde. Darauf folgen die Bezeichnung des Stamms oder Typs und die Ordnungsnummer des daraus isolierten Restriktionsenzym in lateinischen Ziffern (Mülhardt 2009).

Es existieren vier verschiedene Typen von RE:

- Typ I: bestehen aus meist zwei R-, zwei M- und einer S- Untereinheit, welche alle einen Komplex bilden, sind ATP-abhängig, schneiden zufällig, 91 beschriebene Typ I RE
- Typ II: RE und Methylasen (MT), RE erkennen spezifische Sequenzen und schneiden an konstanten Positionen innerhalb oder nahe der Erkennungssequenz, wobei die Phosphatgruppe am 5'-Ende des geschnittenen DNA-Fragments verbleibt, Typ IIP RE erkennen palindromische = symmetrische Sequenzen (4-, 6- bzw. 8-cutter) und schneiden innerhalb dieser Sequenz oder in direkter Nähe, „klassische RE“ (z.B. *EcoRI*), 3760 beschriebene RE, viele Subtypen
- Typ III: bestehen aus zwei verschiedenen Untereinheiten, eine mit Erkennungs- und MT-Domäne, während die zweite die RE-Domäne enthält, sind ATP-abhängig,

besitzen asymmetrische Erkennungssequenzen und schneiden 20-25 Nukleotide entfernt davon, 11 beschriebene RE

- Typ IV: schneiden nur modifizierte (methylierte, hydroxymethylierte und glycosyl-hydroxymethylierte) Basen, besitzen unspezifische Erkennungssequenzen, 5 beschriebene RE (Mülhardt 2009).

| |
|--|
| Verdau |
| 10 µl aufgereinigte Plasmidpräparation |
| 3 µl Puffer (kompatibel zu RE) |
| 1 µl RE 1 |
| 1 µl RE 2 |

Der Ansatz wurde für 1,5 bis 3 Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, bevor er über ein Agarosegel analysiert wurde.

2.1.6 Agarosegelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Trennung von Makromolekülen und wird bei der molekularen Analyse von DNA und RNA eingesetzt.

Kleine Fragmente durchwandern die Matrix schneller als große, da die Siebstruktur der Agarose den kleineren Fragmenten weniger Widerstand bietet. Mit Agarosekonzentrationen von 0,7-2% lassen sich DNA-Fragmente von 3000 bis 10000 Basen gut auftrennen, wobei die höhere Konzentration eine bessere Trennung von kleinen Fragmenten erlaubt, während sich große Fragmente eher bei einer niedrigeren Konzentration trennen lassen. Das Detektieren der Banden erfolgt durch den Phenanthridinfarbstoff Ethidiumbromid (EtBr), welcher seit 1954 zur Behandlung von Rindern bei Trypanosomenbefall in Afrika verwendet wird (Karib et al. 1954). Es ist anzunehmen, dass EtBr, wenn es mit der DNA interkaliert, hauptsächlich Leserastermutationen auslöst, welche für die Zelle tödlich sind. Eine kanzerogenen Wirkung wurde jedoch bisher nicht bestätigt (Copping und East 1986d; Mülhardt 2009).

Zur Durchführung einer Agarosegelelektrophorese wurde die Agarose (0,35 g) in einem halbkonzentrierten (0,5x) Tris-Borat-EDTA-(TBE) Elektrodenpuffer (50 ml) aufgekocht und in eine Kammer gegossen. Ein nach dem Gießen eingesetzter Kamm sorgte für die taschenartigen Vertiefungen. Zum Anfärben der Nukleinsäuren wurde die Lösung mit 0,7 µl einer 1%igen Ethidiumbromidlösung versetzt. Nach völligem Erstarren des Gels und Entfernen des Kamms wurde es nach dem Einsetzen in eine Elektrophoresekammer in Elektrodenpuffer getaucht. Die Proben wurden mit Probenpuffer (1:5) gemischt. Dieser ver-

hindert durch seine höhere Dichte durch Glycerinzusatz ein Auftreiben der Proben aus den Taschen. Durch die enthaltenen Farbstoffe kann die Laufstrecke des Gels bei der Wanderung der Proben kontrolliert werden. Zusätzlich wurde ein Größenmarker aufgetragen, der lineare DNA-Fragmente bekannter Länge enthält.

Nach Erhärten des Gels und dem Anlegen der Spannung laufen die Fragmente umgekehrt proportional zum Logarithmus der Fragmentlänge. Die Elektrophorese ist nach circa einer Stunde beendet. Das Gel wurde nun in ein Ethidiumbromidfärbebad (10 µl auf 200 ml 0,5x TBE-Puffer) gelegt und für 30 min geschwenkt. Ein Nachfärben wurde hauptsächlich bei geringer Genexpression praktiziert und die Agaroselösung wurde demzufolge vorher nicht mit Ethidiumbromidlösung versetzt. Das Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und fluoresziert dann im UV-Licht. Nach dem Entfärben in 0,5x TBE-Puffer können die Banden bei 254 nm detektiert und photographisch dokumentiert werden. Die Auswertung erfolgte anhand des Vergleichs mit dem Längenstandard.

| |
|--|
| 0,5x TBE-Puffer |
| 45 mM Tris |
| 45 mM Borsäure |
| 1,5 mM Na-EDTA |
| Die Pufferbestandteile wurden in Aqua dest. gelöst und autoklaviert. |

Als Probenpuffer diente 6x Loading Dye (10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 60 mM EDTA; 60% Glycerin; 0,03% Bromphenolblau; 0,03% Xylencyanol FF). Man mischte meist einen PCR-Ansatz von 25 µl mit 5 µl Loading Dye.

Der verwendete Längenstandard war der Gene Ruler™ DNA Ladder Mix der Firma Fermentas (jetzt: Thermo Fisher). Er enthält 21 diskrete Fragmente folgender Größe (in Basenpaaren):

10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, **3000**, 2500, 2000, 1500, 1200, **1031**, 900, 800, 700, 600, **500**, 400, 300, 200, 100

Die fett markierten Zahlen sind im Gel als stärkere Banden erscheinende Referenzfragmente und dienen der Orientierung beim Abschätzen der Banden.

2.1.7 Anlegen einer Bakteriendauerkultur

Die Einzelkolonien, die den pET-15b-Vektor mit gewünschter Fremd-DNA enthalten, sollten dauerhaft als Glycerol-Stocks (Glycerin-Dauerkulturen) gelagert werden.

Dazu wurden 425 µl einer ÜN-Kultur mit 75 µl Glycerin vermischt, um den Gefrierschutz zu gewährleisten. Nach gründlichem Mischen und Schockfrieren in flüssigem Stickstoff konnten die Dauerkulturen bei -80 °C gelagert werden.

2.1.8 Aufreinigung/Isolierung des CbRAS-Proteins aus inclusion bodies

Anfinsen war der erste Forscher, der in den 1950er und 1960er-Jahren die Rückfaltung von Ribonuklease untersuchte und das zentrale Dogma postulierte, dass in der Aminosäuresequenz die komplette Information enthalten ist, um das Protein in die native, tertiäre Struktur rückzufalten (Ryle und Anfinsen 1957; Anfinsen 1973).

Bei der Überexpression oder bei Schwerlöslichkeit des Proteins kann es zur Bildung von Einschlusskörperchen (inclusion bodies) kommen. Die unlöslichen Konglomerate enthalten meist unvollständige oder fehlerhaft gefaltete Proteine. Es existiert kein Zusammenhang zwischen dem Hang eines Proteins inclusion bodies auszubilden und seinen intrinsischen Eigenschaften, wie Molekulargewicht, Hydrophobie oder Faltungsmechanismen. Wenn Proteine Disulfidbindungen aufweisen, wird die Bildung von inclusion bodies begünstigt, obwohl die reduzierende Umgebung des Bakterienzytosols eigentlich die Ausbildung von Disulfidbrücken behindert (Patra et al. 2000).

Die Proteine müssen korrekt gefaltet sein, um ihre Funktion übernehmen zu können. Das bedeutet, dass nur „korrekte“ Disulfidbrücken wieder eine Bindung eingehen. Es erfolgt eine oxidative Rückfaltung in den nativen (funktionsfähigen) Zustand (Hidaka 2012). Um eine erneute Proteinaggregation zu verhindern, können chaotrope Reagenzien, wie Harnstoff, Guanidinhydrochlorid, Thiocyanate und Detergenzien, wie *N*-Cetyltrimethylammoniumchlorid und Sarkosin, kombiniert mit Reduktionsmitteln (z.B. Dithiothreitol (DTT), Dithioerythritol oder Cystein), sowie Faltungsadditive wie L-Arginin, zugegeben werden (Patra et al. 2000; Kozai et al. 2009).

Um eine Solubilisierung und Rückfaltung der inclusion bodies zu erreichen, wurde in dieser Untersuchung das Protein Refolding Kit von der Firma Novagen verwendet. Das Kit enthält alle erforderlichen Reagenzien, um rekombinante Proteine, welche als inclusion bodies in *E. coli* akkumulieren, unter milden Bedingungen zu solubilisieren. Nach der Isolierung durch Zentrifugation wurden die Einschlusskörperchen durch Zugabe von CAPS (3-(Cyclo-hexyl-amino)-1-propansulfonsäure) in Kombination mit *N*-Lauroylsarcosin und DTT in einem alkalischen Milieu denaturiert, das heißt die Disulfidbrücken wurden gespalten. Die solubilisierete Fraktion wurde gegen einen pH-neutralen Puffer dialysiert. Dieser enthielt ein reduzierendes Agens, mit welchem die korrekten Disulfidbrückenbindungen geknüpft werden konnten. Ein zweiter Dialyseschritt entfernte überschüssiges Reduktionsmittel und überführte das Protein in den gewünschten Puffer.

Laut Herstellerprotokoll wurden folgende Schritte durchgeführt:

Zunächst wurden 2 x 250 ml LB-Amp-Medium (100 µg Ampicillin pro ml Medium) mit je 1 ml ÜN-Kultur (CbRAS VL 4/1 in pET-15b in *E. coli* BL21(DE3)pLysS) angeimpft, und das

Protein wurde bei 25 °C und 220 UpM für 25 h ohne Induktion durch IPTG heterolog exprimiert. Danach wurden die Bakterien mit den CbRAS-enthaltenden inclusion bodies bei 4 °C durch Zentrifugieren bei 3000 g für 5 min geerntet. Im Anschluss folgten Schockfrieren mit flüssigem Stickstoff und Lagern bei -80 °C.

Um locker assoziierte Kontaminationen zu entfernen, wurden die Bakterienpellets zweimal mit 1× IB Wash Buffer gewaschen. Es folgte ein Resuspendieren der Pellets in 25 ml 1× IB Wash Buffer und anschließendes Aufschließen per Ultraschall (0,3 Zyklen, 100%, 10× 1 min). Zur Vermeidung einer proteolytischen Zerstörung des Zielproteins wurde während des Aufschlusses mit Eis gekühlt. Darüber hinaus folgten nach jeder Minute Aufschluss 1 min Kühlen auf Eis. Laut Sander (2010) erhöht eine Optimierung des Vorgangs die Reinheit und Aktivität der CbRAS. Die Waschschrte wurden von zwei auf vier erhöht. Des Weiteren fand eine dreimalige Wiederholung der Aufschlüsse statt. Um die inclusion bodies zu gewinnen, wurde für 10 min bei 6000 g zentrifugiert, der Überstand konnte verworfen werden. Das Sediment wurde erneut in 25 ml 1× IB Wash Buffer resuspendiert und nach Zentrifugieren das Nassgewicht desselbigen bestimmt. Der Überstand konnte wiederum verworfen werden, und die letzten Flüssigkeitsreste wurden durch umgedrehtes Klopfen des Röhrchens auf ein Einmaltuch entfernt. Ein typisches Nassgewicht liegt bei 1-4 mg/ml Kultur (Herstellerangaben). Es wurden zu den Einschlusskörperchen mit einer Masse von 350 mg 23 ml alkalischer 1× IB Solubilization Buffer, der mit 0,23 ml N-Lauroylsarcosin als Detergens und 23 µl 1 M DTT versetzt war, zugegeben. Nach vorsichtigem Resuspendieren der inclusion bodies wurden diese auf dem Magnetührer in einem Becherglas für 25 min bei Raumtemperatur gerührt. Die gelösten CbRAS-Proteine wurden durch Zentrifugieren bei 6000 g für 10 min bei Raumtemperatur von Zelltrümmern befreit. Währenddessen wurde ein Zellu-Trans Roth® Dialysierschlauch mit einer Porengröße von 25 Å (nominale Filterrate 12,0 kDa) präpariert: Pro 2 ml Flüssigkeit wird 1 cm Schlauch und je 2 cm Überstand pro Ende gerechnet. Vor dem Benutzen muss er zum Quellen für 30 min in Aqua dest. gelegt werden. Generell sollte die Dialyse mit mindestens zwei Pufferwechseln durchgeführt werden. Außerdem sollte der Dialysepuffer die 50-fache Menge des Probenvolumens betragen. Der Überstand wurde mithilfe einer 10 ml Pipette in den Dialysierschlauch gefüllt, mit mehreren Verschlussklammern an beiden Enden verschlossen und gegen 1150 ml 1× Dialysis Buffer mit 115 µl 1 M DTT bei 4 °C unter stetigem Rühren mittels Magnetührstäbchen für mindestens drei h dialysiert. Nach Ablauf der drei Stunden (h) wurde der Dialysierpuffer erneuert, und man ließ über Nacht dialysieren. Am nächsten Morgen wurde der gleiche Puffer ohne die Zugabe von DTT hergestellt, und man ließ erneut für drei Stunden dialysieren. Nach dem Pufferwechsel folgte der letzte Dialysivorgang wieder für drei Stunden. Über die semipermeable Membran können über osmotische Prozesse kleine Moleküle ausgetauscht werden. Da die Anwesenheit von DTT zu einer Reduktion der Ni²⁺-Kationen bei der His-tag-Aufreinigung führt, musste die letzte Dialyse ohne Anwesenheit von DTT durchgeführt werden. Es wurden die RAS-Aktivität (siehe Kapitel 2.1.14), die Proteinkonzentration (siehe Kapitel 2.1.12) sowie die Reinheit mittels SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.1.17) bestimmt.

Um größere Mengen zu erzielen, wurden achtmal 250 ml LB-Amp-Medium mit je 1 ml ÜN-Kultur pro Kolben angeimpft und nach beschriebenem Verfahren bearbeitet. Es wurden insgesamt vier Überstände erzielt.

Zur Optimierung von Menge und Reinheit der CbRAS wurde das korrekt gefaltete Protein aus Rohextrakt 1 nach der Untersuchung erneut unter unterschiedlichen Bedingungen analysiert (siehe Kapitel 2.1.9).

| |
|---------------------------|
| 10× IB Wash Buffer |
| 200 mM Tris-HCl, pH 7,5 |
| 100 mM EDTA |
| 10% Triton X-100 |

| |
|-------------------------------------|
| 10× IB Solubilization Buffer |
| 500 mM CAPS, pH 11,0 |

| |
|----------------------------|
| 50× Dialysis Buffer |
| 1 M Tris/HCl pH 8,5 |

2.1.9 Variationsmöglichkeiten zur Isolierung des CbRAS-Proteins aus inclusion bodies

1. Variante

- PD-10 Säule bei Raumtemperatur äquilibrieren: 25 ml **1× IB Solubilization Buffer**, 0,25 ml N-Lauroylsarcosin (30%), 50 µl 1 M DTT
- 2,5 ml gelöstes und rückgefaltetes Protein aus Rohextrakt 1 auf PD-10 Säule geben, Durchlauf verwerfen
- mit 3,5 ml Puffer (s.o.) eluieren
- bei Raumtemperatur 15 min auf Magnetrührer rühren
- Lösung aus 350 ml H₂O, 7 ml 50× Dialysis Buffer, 35 µl 1 M DTT herstellen, 3,5 ml Proteinlösung in ZelluTrans Roth[®] Dialysierschlauch geben; in 175 ml Puffer für drei Stunden unter Rühren bei 4 °C dialysieren, Puffer wechseln, erneut über Nacht dialysieren, danach die gleiche Menge Dialysierpuffer herstellen und DTT weglassen, noch zweimal für jeweils 3 h dialysieren

2. Variante

- PD-10 Säule bei Raumtemperatur äquilibrieren: 25 ml **10x IB Solubilization Buffer**, 0,25 ml N-Lauroylsarcosin (30%), 50 µl 1 M DTT
- 2,5 ml gelöstes und rückgefaltetes Protein aus Rohextrakt 1 auf PD-10 Säule geben, Durchlauf verwerfen
- mit 3,5 ml Puffer (s.o.) eluieren
- bei Raumtemperatur 15 min auf Magnetrührer rühren
- Lösung aus 350 ml H₂O, 7 ml 50x Dialysis Buffer, 35 µl 1 M DTT herstellen, 3,5 ml Proteinlösung in ZelluTrans Roth® Dialysierschlauch geben; in 175 ml Puffer für drei Stunden unter Rühren bei 4 °C dialysieren, Puffer wechseln, erneut über Nacht dialysieren, danach die gleiche Menge Dialysierpuffer herstellen und DTT weglassen, noch zweimal für jeweils 3 h dialysieren

3. Variante

- PD-10 Säule bei Raumtemperatur äquilibrieren: 25 ml **10x IB Solubilization Buffer, 4,5 M Harnstoff**
- 2,5 ml gelöstes und rückgefaltetes Protein aus Rohextrakt 1 auf PD-10 Säule geben, Durchlauf verwerfen
- mit 3,5 ml Puffer (s.o.) eluieren
- bei Raumtemperatur 15 min auf Magnetrührer rühren
- Lösung aus 350 ml H₂O, 7 ml 50x Dialysis Buffer, 35 µl 1 M DTT herstellen, 3,5 ml Proteinlösung in ZelluTrans Roth® Dialysierschlauch geben; in 175 ml Puffer für drei Stunden unter Rühren bei 4 °C dialysieren, Puffer wechseln, erneut über Nacht dialysieren, danach die gleiche Menge Dialysierpuffer herstellen und DTT weglassen, noch zweimal für jeweils 3 h dialysieren

4. Variante

- PD-10 Säule bei Raumtemperatur äquilibrieren: 25 ml **50 mM Tris/HCl pH 8,5, 6 M Guanidin-HCl, 10 mM DTT** (Kozai et al. 2009)
- 2,5 ml gelöstes und rückgefaltetes Protein aus Rohextrakt 1 auf PD-10 Säule geben, Durchlauf verwerfen
- mit 3,5 ml Puffer eluieren
- die Lösung wird 1 h bei 37 °C inkubiert
- die gelösten Proteine werden im zehnfachen Volumen bestehend aus 100 mM KH₂PO₄ pH 7,4 und 100 mM L-Arginin für 36 h bei 15° C rückgefaltet

2.1.10 Reinigung des CbRAS-Proteins über His-tag-Affinitätschromatographie

Das heterolog exprimierte RAS-Protein aus *Coleus blumei* mit einem N-terminalen 6xHis-Anhang kann über Affinitätschromatographie als natives Protein aufgereinigt werden. Hierfür muss das Enzym in His-tag-Bindepuffer (BP) gelöst vorliegen. Verwendet wird das Ni-NTA His-Bind[®] Resin der Firma Novagen. Der His-tag bindet an Ni²⁺-Kationen, welche an der Nitriloessigsäurematrix (Chelatkomplex) immobilisiert sind. Nach dem Auswaschen der nicht gebundenen Proteine wird das Zielprotein durch Puffer mit erhöhten Imidazolkonzentrationen von dem Säulenmaterial eluiert. Die Aufreinigung basiert auf der Affinität der sechs benachbarten Histidinreste zu dem immobilisierten Metallion (Rehm und Letzel 2010). Die Bindungskapazität beträgt laut Angaben des Herstellers 5-10 mg Protein pro ml Suspension des Matrixmaterials.

Nach Äquilibrieren mit 20 ml His-tag BP der His-tag-Säulchen welche je 2 ml His-Bind[®] Resin enthalten, wurde je ein His-tag-Säulchen mit 9 ml des Rohextrakts versetzt und eine Stunde auf Eis schüttelnd inkubiert, um eine starke Bindung des Zielproteins an das Material zu gewährleisten. Nach Ablassen der Flüssigkeiten wurden alle Durchläufe vereinigt. Jedes Säulchen wurde mit 4 ml Waschpuffer (20 mM Imidazol) gewaschen, dann ein weiteres Mal mit 2 ml. Durch die höhere Imidazolkonzentration des Waschpuffers können unspezifisch gebundene Bakterienproteine, wie Metalloproteasen oder histidinhaltige Proteine, eluiert werden (Rehm und Letzel 2010).

Um das Zielprotein zu eluieren, wurde jedes Säulchen fünfmal mit je 0,5 ml His-tag-Elutionspuffer (250 mM Imidazol) versetzt, um eine vollständige Elution zu erreichen. Der erhöhte Imidazolgehalt verdrängt den His-tag-Anhang des gewünschten Proteins von der Matrix.

His-tag-Waschpuffer: identische Rezeptur wie His-tag-BP, Abweichung: 20 mM Imidazol

His-tag-Elutionspuffer: identische Rezeptur wie His-tag-BP, Abweichung: 250 mM Imidazol

2.1.11 Umpuffern durch PD-10 Säulchen

Die PD-10 Säulchen (GE healthcare, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, UK) enthalten Sephadex[™] G-25 Medium aus Polypropylen und bewirken nach dem Prinzip der Gelfiltration eine Trennung der Moleküle mit hohem Molekulargewicht ($M_r \geq 5000$) von denen mit niedrigem Molekulargewicht ($M_r \leq 1000$). Makromoleküle (z.B. Proteine), die nicht matrixgängig sind, werden als Erstes eluiert.

Die vereinigten Elutionsfraktionen (Volumen muss 2,5 ml betragen) wurden auf je eine PD-10 Säule gegeben, welche vorher mit 20 ml 20 mM Tris/HCl pH 7,5 äquilibriert worden war. Der Durchlauf konnte verworfen werden. Um das Zielprotein zu eluieren, pipettierte man pro PD-10 Säule 3,5 ml 20 mM Tris/HCl pH 7,5 Puffer und lagerte das Eluat auf Eis.

2.1.12 Proteingehaltsbestimmung nach Bradford (1976)

Durch den Bradford-Test (Bradford 1976), benannt nach dem amerikanischen Biochemiker Marion M. Bradford, können Proteinkonzentrationen ermittelt werden. Der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 reagiert in saurer Lösung hauptsächlich mit Argininresten, in einem geringeren Ausmaß auch mit Tyrosin-, Tryptophan-, Histidin-, Phenylalanin-, Lysin- und Alaninresten. Die Bindung erfolgt über elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen. Es kommt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des freien Farbstoffs von 465 nm zu 595 nm im blauen Protein-Farbstoff-Komplex (Compton und Jones 1985). Bei dieser Wellenlänge wird die Absorption der Proben gemessen. Die Intensität der Färbung sowie die Absorption sind proportional zur vorhandenen Proteinkonzentration. Ein BSA-Standard (Rinderserumalbumin Fraktion V), welcher auf einen Wert von 1 mg/ml eingestellt ist, dient der Quantifizierung. Eine Referenz mit Puffer anstelle der Proteinlösung dient als Nullabgleich.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 2 ml Bradford-Reagenz in Einmal-Makroküvetten im 30 s-Takt durch Umdrehen gemischt mit:

- 20 µl Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7,5) als Referenz oder
- 20 µl 1 mg/ml BSA-Standard als Doppelprobe oder
- 20 µl zu messender Proteinlösung als Doppelprobe (eventuell 1:5, 1:10 verdünnt)

Diese Ansätze inkubierte man bei Raumtemperatur für 10 min, bevor die Absorption der Proben im 30-Sekunden-Takt photometrisch gegen die Referenz vermessen und mithilfe der bestimmten Absorption des Standards berechnet wurde.

| |
|---|
| Bradford-Reagenz: |
| 100 mg Coomassie Brilliant Blue G 250 |
| 100 ml 85% o-Phosphorsäure |
| 50 ml 96% Ethanol |
| 850 ml Aqua dest. |
| doppelte Filtration des Ansatzes zur Entfernung von Schwebeteilchen |

2.1.13 Synthese der CoA-aktivierten Säure Caffeoyle-CoA (Caf-CoA)

Da der Thioester Caf-CoA kommerziell nicht oder nur sehr teuer erhältlich ist, wurde er nach einer Vorschrift von Stöckigt und Zenk (1975) aus dem entsprechenden, im Labor synthetisierten und vorrätigen Succinimidester synthetisiert.

Es wurden 25,2 mg NaHCO_3 in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß gewogen und in 1 ml destilliertem Wasser gelöst. Diese Lösung wurde zu weiteren 5 ml Aqua dest. in ein Reagenzglas (mit einer Skalierung gegeben) und 15 min mit Stickstoff begast. 24,6 mg Coenzym A-Trilithiumsalz-Dihydrat wurden in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß eingewogen und in 1 ml der NaHCO_3 -Lösung gelöst. Diese Lösung wurde zurück in das Reagenzglas gegeben und wiederum für 15 min begast. Es wurden 56 mg des entsprechenden Succinimidesters, welcher in 0,5 ml Aceton gelöst wurde, langsam zur CoA-Lösung getropft. Der feine, gelbliche Niederschlag wurde durch Zugabe von ca. 6 ml Aceton aufgelöst. Das mit Nescofilm verschlossene Reagenzglas wurde mit Alufolie umwickelt, und man ließ es über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur stehen.

Um am nächsten Tag das Aceton vollständig zu entfernen, leitete man Stickstoff durch eine Pipette, welche über der Lösung befestigt war, über die Flüssigkeitsoberfläche. Zur Gewährleistung eines konstanten Flusses musste die Pipette ungefähr alle 20 min nachjustiert werden. Diese Prozedur dauerte im Ganzen zwei bis drei Stunden. Nachdem die restliche Flüssigkeit auf 1,5 ml-Eppendorfgefäße verteilt wurde, wurden diese für 10 min bei 5000 g zentrifugiert. Das Reaktionsprodukt, welches sich im gelben Überstand befand, wurde über Dünnschichtchromatographie gereinigt. Dazu wurden zwei Celluloseplatten mit Fluoreszenzindikator (F254) (20 x 20 cm, VWR) und als Fließmittel eine Mischung aus n-Butanol/Essigsäure/Wasser im Verhältnis 5:2:3 verwendet. Die Laufzeit betrug rund 14 h (über Nacht) und die Laufstrecke ca. 18 cm.

Nach dem Trocknen der Platten konnte durch die Fluoreszenzlöschung bei UV-Licht von 254 nm die Bande des Thioesters identifiziert werden (siehe Abbildung 16, links). Der Retentionsfaktor lag bei 0,3. Die markierte Celluloseschicht wurde mit einem Spatel abgekratzt und in ein Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 3 ml Aqua dest. wurde gemischt, bei 3000 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand photometrisch (200-500 nm) vermessen (Abbildung 16, rechts). Dieses Prozedere wurde mit 1 ml Wasser so oft wiederholt, bis keine CoA-Ester mehr detektierbar waren. Die Überstände wurden vereinigt, und nach Einengen in einer Vakuumzentrifuge Identität, Gehalt und Reinheit photometrisch bestimmt.

Der molare Extinktionskoeffizient für Caf-CoA beträgt ϵ (347 nm) = $18 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$

$$c = \frac{V_f \times E}{18} \text{ [mM]}, V_f = \text{Verdünnungsfaktor}$$

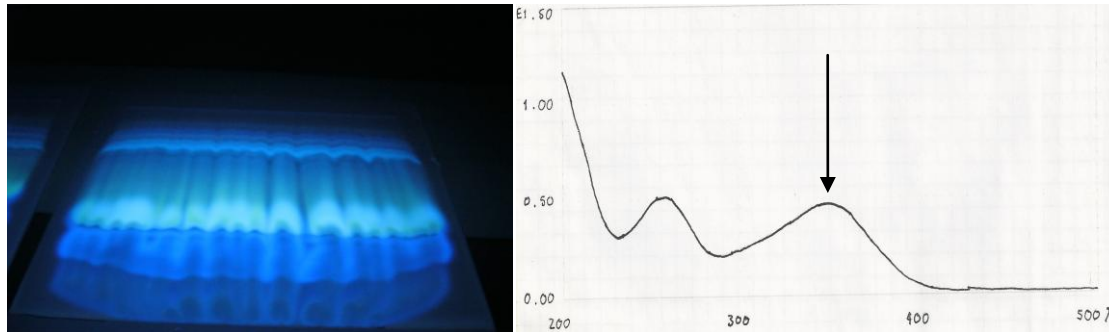


Abbildung 16: Reinigung von Caffeoyl-CoA mittels Dünnschichtchromatographie. Die Bande des Thioesters ist durch die Markierung erkennbar (links: $\lambda = 254$ nm, rechts: UV-Vis-Spektrum von 200 bis 500 nm Wellenlänge, Markierung zeigt Absorptionsmaximum des Thioesters bei 347 nm)

2.1.14 Standardenzymtest zur Bestimmung der RAS-Aktivität

Es wurde folgendes Standardpipettierschema mit einem Gesamtvolumen im Testansatz von 125 μ l verwendet:

| RAS-Enzymtest |
|--|
| 50 μ l Proteinlösung |
| 5 μ l 12,5 mM Ascorbat |
| 12,5 μ l 0,1 M DTT |
| 5 μ l 100 mM pHPL (in 20%igem EtOH) |
| 2 μ l 3,2 mM Caf-CoA |
| 50,5 μ l KP_i -Puffer (0,1 M KH_2PO_4/K_2HPO_4 pH 7,0) |

Nach Ansetzen und Aliquotieren eines entsprechenden Mastermixes aus allen Reaktionskomponenten außer dem Enzym wurde die Reaktion durch Zugabe des Enzyms gestartet. Die Inkubationszeit betrug 5 min bei 30 °C. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte mit 20 μ l 6 N HCl, Mischen und anschließender Lagerung auf Eis.

Die Reaktionsprodukte wurden durch Zugabe von Ethylacetat extrahiert. Dies erfolgte durch Zugabe von 500 μ l Ethylacetat, gründliches Mischen und Abzentrifugieren bei 16000 g für 5 min. Nach dem Abheben der oberen Phase wurde das Vorgehen noch zwei weitere Male wiederholt. Die Ethylacetatphasen wurden in einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß vereinigt und zur Trockene eingedampft.

Die Rückstände wurden in 100 μ l Fließmittel (40 oder 50% Methanol, 0,01% Phosphorsäure) gelöst, kurz zentrifugiert und mittels HPLC analysiert.

2.1.15 HPLC-Analyse

Durch die high performance liquid chromatography (HPLC) können Reaktionsprodukte detektiert und quantifiziert werden. Zur isokratischen RP-HPLC wurde eine Equisil ODS-Säule (250 × 4,0 mm) mit einer Partikelgröße von 5 µm und einer Vorsäule (20 × 4,0 mm) benutzt. Bei einer Flussrate von 1 ml/min und Detektionswellenlängen von 290 oder 333 nm wurde mit einem 40 oder 50% Methanol (MeOH)-Wasser-Gemisch, welches mit 0,01% Phosphorsäure angesäuert ist, eluiert. Die Ansäuerung ist notwendig, damit die Produkte vollständig in protonierter Form vorliegen und somit in einem Peak per HPLC bestimmt werden können.

2.1.16 Aufkonzentrierung/Umpuffern mit Vivaspin 20 Zentrifugalkonzentratoren

Über das Prinzip der Größenausschlusschromatographie mit einer Größenausschlussgrenze von 10 kDa durch eine vertikale Zwillingmembran aus Polyethersulfon kann eine Aufkonzentrierung sowie eine Umpufferung der Proben erreicht werden.

Durchführung:

Der Proteingehalt wurde nach der His-tag-Aufreinigung (siehe Kapitel 2.1.10) der Probe durch einen Bradford-Test (siehe Kapitel 2.1.12) bestimmt. Anschließend wurden 10 ml der Lösung in die Vivaspin 20 Filtereinheit (Sartorius, Göttingen, Deutschland) gegeben. Die Filtereinheit wurde in einem Schwenkrotor in der Zentrifuge bei 4° C für 7 min bei 3000 g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde die aufkonzentrierte Lösung mit einer Pipette aufgewirbelt. Der Vorgang wurde so lange wiederholt (ca. 0,5 Stunden), bis nur noch ein Zehntel des ursprünglichen Volumens in der Filtereinheit vorhanden war. Nach dem Konzentrationsvorgang gab man 10 ml des gewünschten Puffers in die Filtereinheit und zentrifugierte erneut unter den genannten Bedingungen. Die Proteinkonzentration wurde erneut durch einen Bradford-Test (siehe Kapitel 2.1.12) bestimmt.

2.1.17 SDS-PAGE

Die sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) wurde 1970 von Ulrich Laemmli zum ersten Mal beschrieben. Durch die Zugabe von dem Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat) werden die Proteine denaturiert. Dadurch werden nicht-kovalente Proteinaggregate gelöst, sodass sich die Proteine im Gel annähernd proportional ihrer Größe bewegen. SDS ist negativ geladen und überdeckt die Eigenladung der Proteine. Durch Vergleich mit einem Marker kann die molekulare Masse unbekannter Proteine bestimmt werden.

Die diskontinuierliche SDS-PAGE bestand aus einem Trenngel und einem Sammelgel, welches über das Trenngel geschichtet wurde. Nach Zugabe der Polymerisationsstarter N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED) und Ammoniumperoxodisulfat (APS) zur Quervernetzung sollte zügig gearbeitet werden, da sonst die Gefahr des vorzeitigen Auspolymerisierens bestand. Das Trenngel wurde mit 0,5 ml n-Butanol überschichtet, denn es glättet die Oberfläche und bildet eine Art Schutzschicht. Dadurch können Grenzflächeneffekte zwischen dem Gel und der Luft vermieden werden. Bei einer Überschichtung mit Wasser

könnte der darin enthaltene Sauerstoff Radikale abfangen, und die Auspolymerisierung würde ungleichmäßig ablaufen. Nach ca. 20 min war das Trenngel ausgehärtet, und das Butanol wurde mit einem Filterpapier abgesaugt. Das Sammelgel wurde gut gemischt, über das Trenngel geschichtet und in das flüssige Sammelgel der Probenkamm gesteckt. Die Proben wurden im Sammelgel aufkonzentriert, bevor sie im Trenngel nach ihrer Größe aufgetrennt wurden.

| Trenngel | Sammelgel |
|---|--|
| 1,25 ml 1,5 M Tris/HCl pH 8,0 | 625 µl 0,5 M Tris/HCl pH 6,8 |
| 1,45 ml Aqua dest. | 1,4 ml Aqua dest. |
| 2,05 ml 30%ige Acrylamidstammlösung mit 2% Bisacrylamid | 375 µl 30%ige Acrylamidstammlösung mit 2% Bisacrylamid |
| 200 µl 10% SDS | 100 µl 10% SDS |
| 8 µl N,N,N',N'-Tetramethyldiamin | 5 µl N,N,N',N'-Tetramethyldiamin |
| 35 µl 10% Ammoniumperoxydisulfat | 20 µl 10% Ammoniumperoxydisulfat |

Zu 15 µl Probe wurden 5 µl Roti®-Load Probenpuffer gegeben und zum Denaturieren der Proteine für 5 min in kochendem Wasser erhitzt und kurz zentrifugiert. Danach konnten die Proben in die Probentaschen des Gels aufgetragen werden. Nach dem Aufbau der Apparatur goss man Elektrophoresepuffer bis zur Markierung und entfernte vorsichtig den Kamm, ohne die Taschen zu beschädigen. Eventuell noch vorhandene Gelreste wurden durch Spülen (Aqua dest.) mit einer 10 µl Pipette entfernt. Die Proben wurden in die Taschen pipettiert. Als Standard dienten der Roti®-Mark Standard oder der Roti®-Mark Plus (Abbildungen 17 und 18). Nach Zusammensetzen der Apparatur wurden 180 V angelegt und das Gel nach ca. 2 h Laufzeit im Färbepuffer für mindestens 1 h geschwenkt. Durch die enthaltene Essigsäure können die Proteine im Gel fixiert werden. Nach dem Entfärben bleibt die blaue Farbe an den Stellen, an denen Proteine fixiert sind, sichtbar. Zu Dokumentationszwecken wurde das Gel eingescannt.



Abbildung 17: Roti®-Mark Standard

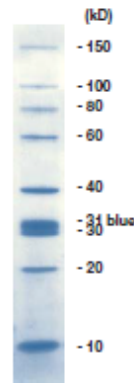


Abbildung 18: Roti®-Mark Plus

| Laufpuffer |
|-----------------------|
| 0,1% SDS |
| 192 mM Glycin |
| 25 mM Tris/HCl pH 8,3 |

| Färbelösung | Entfärbelösung |
|---------------------------------------|-------------------|
| 0,625 g Coomassie Brilliant Blue R250 | |
| 50 ml Eisessig | 50 ml Eisessig |
| 225 ml Aqua dest. | 225 ml Aqua dest. |
| 225 ml Methanol | 225 ml Methanol |

2.1.18 PAGE unter nativen Bedingungen

Ornstein (1964) und Davis (1964) entwickelten die Methode der diskontinuierlichen Elektrophorese, welche eine Trennung von nativen Proteinen möglich machte. Die Trennung der Proteine erfolgt hier nicht nur nach Molekulargewicht, sondern auch nach Ladung der Proteine im umgebenden pH-Milieu. Die Gele und der Elektrodenpuffer wurden wie für die SDS-PAGE angefertigt, jedoch ohne den Zusatz von SDS. Mit dieser Methode sollte überprüft werden, ob unterschiedlich gefaltete Proteinpopsulationen bei der RAS vorlagen.

Probenbehandlung und Elektrophorese:

4 Volumenteile Probe und 1 Volumenteil Probenpuffer wurden gemischt. Nach 15-minütiger Inkubationszeit wurden die Proben auf das Sammelgel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde unter gleichen Bedingungen wie die SDS-PAGE durchgeführt.

| Probenpuffer für die native Elektrophorese |
|---|
| 3,3 ml 1,9 M Tris/HCl pH 6,8 |
| 6,6 ml Glycerin |
| 0,1 ml 1% Bromphenolblaulösung |

2.1.19 Transformation von SoluBL21TM Competent *E. coli*-Zellen

Transformation bedeutet die Aufnahme fremder DNA in die Zellen. Griffith konnte 1928 zum ersten Mal dieses Phänomen nachweisen. Die entsprechende Bezeichnung erhielt es 1944 durch McCarty und Avery (Avery et al. 1944). Um eine Kompetenz (Durchlässigkeit) zu erzielen, werden chemische (CaCl₂) und physikalische (Hitzeschock und Elektroporation) Verfahren verwendet.

Da die RAS hauptsächlich aufgrund der schlechten Löslichkeit in inclusion bodies vorliegt (Sander 2010), wurde versucht, durch Expression in den chemisch kompetenten SoluBL21TM *E. coli*-Zellen die Löslichkeit des RAS-Proteins zu erhöhen.

Zu 50 µl der chemisch kompetenten SoluBL21TM-Zellen wurden 5 µl der Plasmidpräparation gegeben. Nach sanftem Mischen wurde für 15 min auf Eis inkubiert. Zum Erzielen einer Porosität der Zellwände erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für exakt 45 Sekunden. Die Plasmid-DNA drang in die Zellen ein. Damit sich die Zellen wieder „erholen“ konnten, gab man 0,25 ml SOC-Medium (Kapitel 4.2.2) dazu und inkubierte für 60 min bei 37 °C im Schüttler. Die transformierten Bakterien wurden auf eine LB-Agarose Platte mit Ampicillin (100 µg Ampicillin pro ml LB-Medium) als Selektionsmarker gegeben und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Eine erfolgreiche Transformation erkannte man an gewachsenen Kolonien, die durch Aufnahme des Plasmids eine Ampicillinresistenz erworben haben.

2.1.20 Expression der CbRAS in SoluBL21TM Competent *E. coli*-Zellen

Die gepickten Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher in 2 ml M9-Minimalmedium (4.2.3) gegeben, da laut Herstellervorschrift die Proteinexpression in SoluBL21TM *E. coli*-Zellen in diesem Medium optimal ist. Zur Gewährleistung der Antibiotikaresistenz wurde als

Selektionsmarker 10 µl Ampicillin (20 mg/ml) zugegeben. Man ließ bei Raumtemperatur (25 °C) und 200 UpM über Nacht schütteln.

Die Bakterienzellen wurden mit dem gleichen Medium verdünnt, bis sie eine $OD_{600} = 0,2$ aufwiesen. Man ließ die Zellen so lange bei 37 °C wachsen, bis sie eine $OD_{600} = 0,4$ aufwiesen. Zur Induktion gab man IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1 mM hinzu. Man inkubierte die Zellen über Nacht bei Raumtemperatur und 200 UpM. Nach Ablauf der Induktionszeit wurden die Kolben auf Eis gestellt und die Bakterien bei 3000 g 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Die erhaltenen Pellets wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Die Sedimente wurden langsam auf Eis aufgetaut, in der vierfachen Menge 0,1 M KP_i Puffer pH 7,0 resuspendiert und dann mittels Ultraschall (0,3 Zyklen, 100%) aufgeschlossen. Um eine Proteindenaturierung zu vermeiden, wurde bei der Behandlung mit der Sonotrode gleichzeitig mit Eis gekühlt. Der durch Zentrifugation bei 6000 g für 10 min bei 4 °C erhaltene Überstand wurde abgenommen und das Pellet konnte verworfen werden.

Der CbRAS-Rohextrakt wurde mit einem Enzymtest auf Aktivität (siehe Kapitel 2.1.14) und über SDS-PAGE auf seine Reinheit (siehe Kapitel 2.1.17) untersucht.

2.1.21 Optimierte Expressionsbedingungen in SoluBL21TM Competent *E. coli*-Zellen

Da die ÜN-Kulturen kaum Wachstum aufwiesen, wurde das M9-Minimalmedium (siehe Kapitel 7.3.3), nach Rücksprache mit einem Mitarbeiter der betreffenden Firma, durch LB-Medium (siehe Kapitel 7.3.1) ersetzt. Außerdem wurde vor der Ultraschallbehandlung 1 mg/ml Lysozym zugegeben. Da dieser *E. coli*-Stamm kein pLysS-Plasmid besitzt (siehe Kapitel 2.1.1), erhöht Lysozym die Porosität der Zellwände.

2.1.21.1 Expression in 100 ml LB-Medium

Nach Induktion mit 1 mM IPTG und einer Inkubationsperiode in 100 ml LB-Medium von 16 h bei 25 °C unter Schütteln wurde die Bakteriensuspension bei 3000 g für 5 min zentrifugiert. Das Gewicht der Bakterienpellets wurde bestimmt, dann wurden sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Nach dem langsamen Auftauen auf Eis gab man die vierfache Menge an 0,1 M KP_i -Puffer pH 7,0 hinzu und resuspendierte gründlich. Darauf folgend fügte man 1 mg/ml Lysozym hinzu und inkubierte 30 min auf Eis. Die Mischung wurde für 10 min bei 5000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Rohextrakt konnte nun für die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (siehe Kapitel 2.1.12), für eine His-tag-Aufreinigung (siehe Kapitel 2.1.10), für die SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.1.17) und für Enzymtests verwendet werden.

2.1.21.2 Bestimmung des Aktivitätsmaximums des CbRAS-Proteins

Um das Aktivitätsmaximum der CbRAS (siehe Kapitel 2.1.14) zu ermitteln, wurden mithilfe der Elutionsfraktion aus 100 ml Bakteriensuspension verschiedene Konzentrationen (unverdünnt, 1:10, 1:50) getestet.

2.1.21.3 Expression in 1000 ml LB-Medium

Um die Expression im größeren Maßstab zu analysieren, wurde sie in 1000 LB-Amp-Medium unter gleichen Bedingungen (siehe Kapitel 2.1.21.1) durchgeführt. Die Reinheit wurde mittels SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.1.17) und die Aktivität mit einem Enzymtest (siehe Kapitel 2.1.14) überprüft.

2.1.22 Veränderung der Imidazol-Konzentration des His-tag-Waschpuffers

Um durch den Waschvorgang schon Verunreinigungen zu entfernen, wurde die optimale Imidazolkonzentration empirisch bestimmt. Es wurden Waschvorgänge mit Imidazol-Konzentrationen von 20, 50, 75, 100 und 150 mM durchgeführt und das Ergebnis über SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.1.17) überprüft.

2.1.23 Aufkonzentrierung durch TCA-Fällung

Da die Waschfraktionen mit den verschiedenen Imidazol-Konzentrationen einen zu niedrigen Proteingehalt aufwiesen, der weit unter der Nachweisgrenze für eine SDS-PAGE lag, wurden die einzelnen Fraktionen über eine Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) aufkonzentriert. Die Methode der Auflösung der Hydrathüllen von Proteinen wurde schon 1967 von Bennett durchgeführt.

Laut Protokoll wurden 500 g TCA in 350 ml Aqua dest. gelöst. Pro Probenvolumen wurde ein Viertel der TCA-Lösung addiert und 20 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Probe bei 4 °C für 10 min bei 13700 g zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstands war ein weißes Pellet sichtbar.

Das Pellet wurde zweimal mit 200 µl eiskaltem Aceton gewaschen und danach unter dem Abzug getrocknet. Die Probe wurde in 20 µl 20 mM Tris/HCl pH 7,5 gelöst und über SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.1.17) untersucht.

2.1.24 Reinigung des Proteins über Gelpermeationschromatographie

2.1.24.1 GPC Säule HiLoad™ 26/60 Superdex 200

Da die CbRAS auch nach verschiedenen Waschvorgängen mit unterschiedlichen Imidazolkonzentrationen immer noch (für Kristallisationsversuche) zu stark mit Fremdproteinen verunreinigt war, wurde eine Gelpermeationschromatographie (GPC) mit einer Äkta FPLC (GE Healthcare Europe GmbH, früher: Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) durchgeführt.

Es wurden erneut Bakterienpellets in je 5 ml 0,1 M KPi -Puffer pH 7,0 resuspendiert und mit der entsprechenden Menge Lysozym versetzt (siehe Kapitel 2.1.21.1). Nach dem Aufschluss erfolgte die Aufreinigung mittels His-tag (siehe Kapitel 2.1.10). Die Säule wurde nach Ablassen des Durchflusses zweimal mit je 5 ml 20 mM His-tag-WP gewaschen und dreimal mit je 1,5 ml 100 mM His-tag-Elutionspuffer eluiert. Das Eluat wurde über Vivaspin 20 Zentrifugalkonzentratoren in einen 20 mM Tris-HCl Puffer pH 7,5 umgepuffert und auf 3 ml mit einer Protein-Endkonzentration von 2,26 mg/ml aufkonzentriert.

Danach wurde eine präparative Gelfiltrationschromatographie über eine mit 20 mM Tris/HCl pH 7,5 prä-äquilibrierten HiLoad™ 26/60 Superdex 200-Säule (GE Healthcare Europe GmbH, früher: Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) angeschlossen. Das Material der Säule beruht auf kovalenten Bindungen zwischen Dextran zu hoch cross-verlinkter Agarose und die Trennung der Proteine erfolgt durch Größenausschlusschromatographie (Angaben des Herstellers). Die Superdex 200-Säule hat einen Trennbereich von M_r 10000-600000. Die einzelnen gesammelten Fraktionen wiesen ein Volumen von jeweils 10 ml auf.

Die gesammelten Fraktionen wurden über SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.1.17) untersucht. Die Fraktionen mit dem höchsten Gehalt an CbRAS-Protein wurden vereinigt, über Vivaspin 20 aufkonzentriert (siehe Kapitel 2.1.16) und erneut über SDS-PAGE analysiert.

2.1.24.2 GPC Säule HiLoad™ 26/60 Superdex 75

Da die Endfraktion immer noch starke Verunreinigungen zeigte, wurde die Gelfiltration mit einer mit 20 mM Tris/HCl pH 7,5 prä-äquilibrierten HiLoad™ 26/60 Superdex 75-Säule (GE Healthcare Europe GmbH, früher: Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) wiederholt, welche einen Trennbereich von M_r 3000-70000 aufweist. Um eine größere Reinheit der Fraktionen zu gewährleisten, wurden die einzelnen Fraktionsvolumina auf jeweils 1,5 ml reduziert.

2.1.25 Kristallisationsversuche

Sumner gelang 1926 erstmals die Isolierung und Kristallisation des Enzyms Urease und der Proteine Concanavalin A und B aus *Canavalia ensiformis*. 1932 begann Dorothy Crowfoot Hodgkin mit der Kristallstrukturaufklärung des Insulins, welche über 30 Jahre dauern sollte. Kendrew konnte 1958 die erste Struktur eines Proteins (Myoglobin) mithilfe der Röntgenkristallstrukturanalyse aufklären.

Um passende Kristallisationsbedingungen zu finden, kann die „hanging drop“ oder die „sitting drop“ Methode angewendet werden. In einer Vertiefung („well“) auf einer 96-well Platte (siehe Abbildung 19) befindet sich seitlich oder mittig die Proteinlösung, in einem Reservoir sind 500 μl der Pufferlösung vorhanden, welche oft hochkonzentrierte Salze, Alkohole oder Polyethylenglykole enthält. Es stellt sich eine Balance zwischen der Tropfen- und der Pufferlösung ein. Durch das Verringern des Tropfenvolumens steigt die Proteinkonzentration. Es wird ein metastabiler Zustand angestrebt, in dem eine Keimbildung erfolgt, aber sich noch

kein amorphes Präzipitat bildet. In einer ungesättigten Lösung geht die feste Phase in Lösung, in einer übersättigten Lösung entsteht das Präzipitat. Der Sättigungspunkt hängt hauptsächlich von der Proteinkonzentration, der Ionenstärke, der Temperatur, dem pH-Wert und der Bindung von Gegenionen oder spezifischen Liganden an das Protein ab. Es werden verschiedene Bedingungen getestet, um die für das Kristallwachstum optimale Variante zu bestimmen.

Man nennt dieses Verfahren auch Aussalzen: Bei einer höheren Ionenstärke konkurrieren die Ionen um das sie umgebende Wasser, dem gelösten Stoff werden Wassermoleküle entzogen, und die Löslichkeit sinkt. Ein Protein ist umso löslicher, je höher seine Nettoladung ist. Am isoelektrischen Punkt ist die Nettoladung am geringsten, somit liegt die geringste Löslichkeit vor. Die wichtigsten Punkte sind die Keimbildung und das folgende Kristallwachstum, welche teilweise sehr zeitintensiv sein können (Wehr 2002).

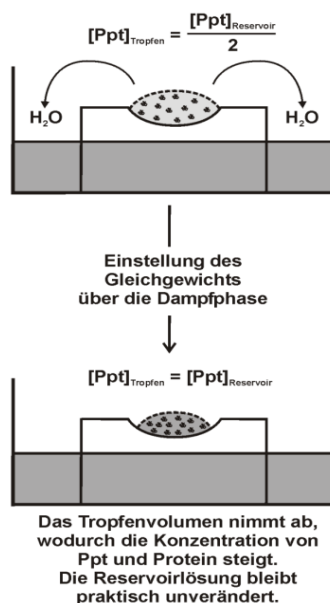


Abbildung 19: Mechanismus der Kristallisation (links) und Kristallisationsplatten (rechts), aus Präsentation „Kristallographie“ Prof. Dr. K. Reuter

Um unterschiedliche Bedingungen zu analysieren, wurden sogenannte „in-house-screens“ durchgeführt. Hier wurde eine CbRAS-Proteinlösung, noch vor der weiteren Aufreinigung durch Gelfiltration, mit einer Konzentration von 5,12 mg/ml benutzt. Es wurde das „sitting-drop“ Verfahren praktiziert (siehe Abbildung 19). Man benutzte eine Kristallisationsplatte mit jeweils 24 Vertiefungen. In den Außenbereich der well-Vertiefung wurden jeweils 500 μ l eines bestimmten Puffers gegeben. In die Mitte der well-Vertiefung gab man 1 μ l der Proteinlösung und vermischte diesen Tropfen mit 1 μ l der Pufferlösung aus dem Reservoir. Die Platten wurden mit einer speziellen Klebefolie verschlossen, damit sich ein Gleichgewicht einstellen konnte.

Folgende „in-house-screens“ wurden untersucht: Hampton Crystal Screen, Wizard I und II und Cryo I und II.

Um eine breitere Auswahl an Kristallisationsbedingungen im Hochdurchsatzverfahren zu erzielen, wurde der Kristallisationsroboter Cartesian MicrosysTM SQ4000 (siehe Abbildung 20) verwendet. Es wurde ebenfalls das „sitting-drop“ Verfahren praktiziert. Pro Platte standen 96 verschiedene Bedingungen zur Verfügung. Es wurden folgende Kits der Firma Qiagen verwendet: JCSG Core Suite I/II/III; PACT Suite, JCSG+ Suite und Classics Suite.

Der Roboter pipettierte exakt 200 nl der Proteinlösung und 200 nl der Pufferlösung (500 µl im Reservoir) pro well. Außerdem konnten zwei Bedingungen getestet werden. Es wurden gleichzeitig eine hohe Proteinkonzentration mit 8,8 mg/ml und eine geringere Proteinkonzentration mit 4,4 mg/ml, nach der Gelfiltrationschromatographie mit der HiLoadTM 26/60 Superdex 75-Säule, getestet.

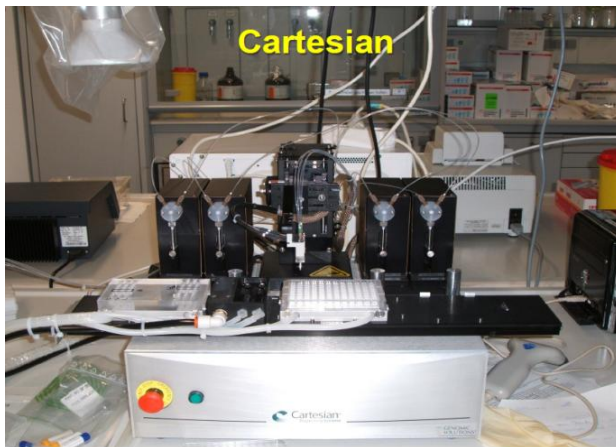


Abbildung 20: Kristallisationsroboter Cartesian MicrosysTM SQ4000, Präsentation „Kristallographie“ Prof. Dr. K. Reuter

Die Parameter Temperatur (4 °C, 18 °C), Salzkonzentrationen, Pufferkonzentrationen und pH-Wert wurden zudem vielfältig variiert.

2.1.26 His-tag-Abspaltung

Da sich der His-tag möglicherweise störend auf die Kristallisation auswirken könnte, wurde mithilfe des Clean CleavageTM-Kits versucht, den Fusions-tag abzuspalten. Hinter den 6xHis-tag-Resten befindet sich in dem pET-15b-Vektor eine Thrombin-Schnittstelle (siehe Abbildung 21). Mithilfe dieser kann der His-tag abgespalten werden. Das Thrombin ist an eine Agarosematrix fixiert und kann nach der Abspaltung durch Zentrifugation entfernt werden.

Der Rohextrakt wurde unter Standardbedingungen gewonnen (siehe Kapitel 2.1.21.3) und über His-tag (siehe Kapitel 2.1.10) routinemäßig aufgereinigt. Nach dem Äquilibrieren der Vivaspin 20 Zentrifugalkonzentratoren mit dem 1x Clean Cleavage Buffer wurde das Protein

darin umgepuffert und auf 1 ml aufkonzentriert (siehe Kapitel 2.1.16). Die Proteinkonzentration lag nach Bradford-Bestimmung bei 1 mg/ml (siehe Kapitel 2.1.12).

Das Thrombin-Agarose-Material muss homogen aufgeschlämmt sein. 100 µl der 50%igen Suspension wurden sanft bei 500 g zentrifugiert, um das Material zu sedimentieren. Der Überstand konnte verworfen werden. Um das Pellet zu waschen, gab man 2 x 500 µl 1x Clean Cleavage Buffer hinzu, zentrifugierte und verwarf den Überstand. Mit 100 µl 10x Clean Cleavage Buffer wurde die Thrombin-Agarose resuspendiert, 600 µl Proteinlösung wurden hinzugefügt und mit Aqua dest. auf 1 ml aufgefüllt. Man inkubierte bei Raumtemperatur unter sanftem Schütteln. Aliquots wurden nach 1, 2, 4, 6 und 24 h entnommen, kurz zentrifugiert und der Überstand durch SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.1.17) analysiert.

Da es zu einem Ausfällen des Proteins und somit zu einer Proteindetektion nur nach 1 h kam, wurde versucht, durch Zugabe von Dimethylsulfoxid (DMSO) die Löslichkeit zu erhöhen. Das Thrombin-Agarose-Material wurde unter den gleichen Bedingungen gewaschen. Zu dem voräquilierten Material gab man 100 µl 1x Clean Cleavage Buffer, 100 µl DMSO und 700 µl Proteinlösung mit einer Konzentration von ~ 1 mg/ml. Die Proben wurden nach 1, 2, 4, 6, 24, 33 und 72 h entnommen. Nach dem jeweiligen Abzentrifugieren der Thrombin-Agarose wurde auch das Pellet nach 72 h untersucht, um zu bestimmen, wieviel ungelöstes Protein sich noch im Sediment befand.

| |
|----------------------------------|
| 10x Clean Cleavage Buffer |
| 500 mM Tris/HCl pH 8,0 |
| 100 mM CaCl ₂ |

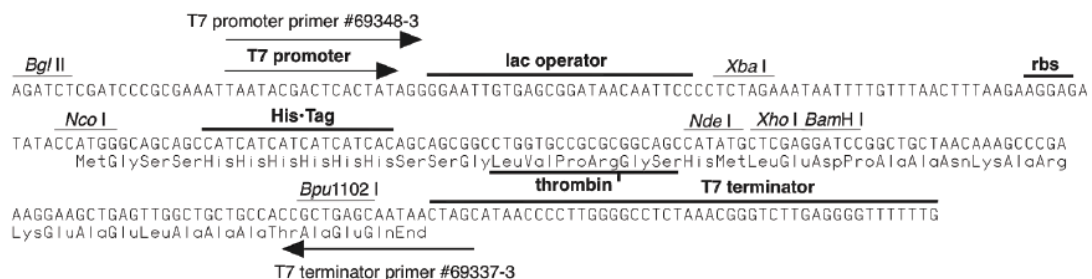


Abbildung 21: pET-15b Klonierungs-/Expressionsregion mit 6x His-tag und Thrombinschnittstelle

2.2 Aktivitätstests von Chimären aus *Coleus blumei*

Der Begriff Chimäre (Χίμαιρα, *Chímaira*, „die Ziege“) stammt aus der griechischen Mythologie und bezeichnet ein Mischwesen (Lissauer et al. 2007). In der Molekularbiologie werden Teile von Proteinen ausgetauscht und die Enzymaktivitäten der resultierenden Mischproteine bestimmt. Je nach Substratspezifität kann man Rückschlüsse auf die an der Katalyse beteiligten Aminosäuren ziehen.

Die isolierten Expressionsplasmide pET-15b CbRAS und pET-15b CbHST standen zur Verfügung (Sander 2010). Durch kreuzweise Ligation entstanden die chimären Sequenzen RAS-HST und HST-RAS (siehe Kapitel 3.4). Neben diesen Chimären wurden von M. Sander noch weitere Chimären im Rahmen ihrer Dissertationsarbeit hergestellt. Es existierten jeweils vier Varianten von HST-RAS und RAS-HST, die unterschiedliche Klone von ein- und derselben Platte, also einem Transformationsansatz, sind.

Zur Bestimmung der Aktivität von HST-RAS und RAS-HST wurden für vier Expressionslinien vier 250 ml Erlenmeyerkolben mit jeweils 100 ml LB-Amp-Medium mit 400 µl ÜN-Kultur angeimpft und für 24 h bei 25 °C bei 220 UpM inkubiert. Die vier Expressionsansätze wurden separat geerntet und zweimal mit 4 ml 0,1 M KP_i -Puffer, pH 7,0 mit 1 mM DTT pro g Pellet mittels Ultraschall aufgeschlossen.

Um die RAS-Enzymaktivität festzustellen, wurde der Standardenzymtest mit 4-Hydroxyphenyllactat (pHPL) als Akzeptorsubstrat und 100,5 µl Enzymaufbereitung (siehe Kapitel 2.1.14) durchgeführt.

Zur Bestimmung der HST-Enzymaktivität wurde ein weiterer Enzymtest mit Shikimisäure als Akzeptorsubstrat durchgeführt.

| HST-Enzymtest |
|--------------------------|
| 100,5 µl Enzym |
| 5 µl 12,5 mM Ascorbat |
| 12,5 µl 0,1 M DTT |
| 5 µl 100 mM Shikimisäure |
| 2 µl 3,2 mM Caf-CoA |

Im Gegensatz zur Aktivitätsbestimmung für Wildtyp-Enzyme wurden im Enzymtest bei den Mutanten 100,5 µl Proteinpräparation und dementsprechend kein KP_i -Puffer eingesetzt, da die Chimären durch ihre Konstruktion eine geringere Aktivität aufweisen. Um zu bestimmen, bei welchem Zeitpunkt die höchste Aktivität vorliegt, wurden 24 h-Enzymtests mit zweistündiger Probenziehung bei 30 °C durchgeführt. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte mit

20 µl 6 N HCl und anschließender Lagerung auf Eis. Um die Messungen zu verifizieren, wurden mit den gleichen Rohextrakten 4 h-Enzymtests durchgeführt.

Die Reaktionsprodukte wurden durch Zugabe von Ethylacetat extrahiert. Dies erfolgte durch Zugabe von 500 µl Ethylacetat, gründlichem Mischen und Abzentrifugieren des Überstands bei 16000 g für 5 min. Nach dem Abheben der oberen Phase wurde das Vorgehen noch zwei weitere Male wiederholt. Die Ethylacetatphasen wurden in einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß vereinigt und zur Trockene eingedampft.

Die Rückstände wurden in 100 µl Fließmittel, welches bei dem Akzeptorsubstrat pHPL die Zusammensetzung 50% Methanol, 0,01% Phosphorsäure hatte, gelöst, kurz zentrifugiert und über HPLC bei einer Wellenlänge von 333 nm analysiert. Wenn als Akzeptorsubstrat Shikimisäure untersucht wurde, wurde folgende Fließmittelzusammensetzung verwendet: 35% Methanol, 0,01% Phosphorsäure (Sander 2010).

2.3 Untersuchungen von *Glechoma hederacea*-Pflanzen

2.3.1 RNA-Isolierung aus Blättern, Blüten, Stängeln und Wurzeln nach Chomczynski und Sacchi

Die Blätter, Blüten, Stängel und Wurzeln von *Glechoma hederacea* wurden im Alten Botanischen Garten Marburg geerntet und unter fließendem Wasser gut gereinigt. Sie wurden entweder direkt zur Isolierung von RNA oder zur Bestimmung des RA-Gehalts (siehe Kapitel 2.4.9) verwendet oder bei -80 °C eingefroren.

Das Gewinnen von intakter, funktionstüchtiger messenger-RNA (mRNA) ist in der Molekularbiologie von fundamentaler Bedeutung, da sie das Transkriptionsprodukt derjenigen Gene repräsentiert, die zu untersuchen sind. Sie enthält am 5'-Ende eine 7-Methylguanosin-„Kappe“ (5'-Cap) und am 3'-Ende eine Poly-Adenosin-Sequenz, welche als Poly-A-Schwanz bezeichnet wird und für die Aufreinigung und PCR benötigt wird (Mülhardt 2009). Hier wurde die Ein-Schritt-Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) zur Isolierung von Gesamt-RNA (ribosomaler-, Transfer- und messenger-RNA = 2% der Gesamt-RNA) praktiziert.

Sämtliche Geräte (Mörser und Spatel) und zu verwendende Lösungen wurden doppelt autoklaviert oder alternativ zwei Stunden bei 200 °C „gebacken“.

In einem mit flüssigem Stickstoff gut vorgekühlten Mörser wurde das Pflanzenmaterial fein zerrieben. In sechs vorgekühlte 2 ml-Eppendorfgefäße wog man jeweils rund 50 mg des fein gemörserten Materials ein und gab 500 µl Lösung D dazu. Das denaturierende Agens muss in Kontakt mit den zerstörten Zellen kommen. Guanidinthiocyanat, ein Bestandteil der Lösung D, ist ein chaotropes Salz, das Proteine und Ribonucleasen (RNasen) äußerst effektiv denaturiert. Um die Effizienz zu steigern, wurde 5 min unter mehrmaligem Suspendieren bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand war bei den Blättern intensiv grün, bei den Blüten rosafarben.

Anschließend wurden unter häufigem, sanftem Invertieren 50 µl 2 M Natriumacetatlösung pH 4,0, 500 µl eiskaltes Phenol (mit Citrat-Puffer gesättigt) und 100 µl eiskaltes Chloroform addiert. Nach kräftigem Mischen (10 s) inkubierten die Proben für 15 min auf Eis, ehe sie für 15 min bei 4 °C und 12000 g zentrifugiert wurden. Dadurch können Proteine und DNA sedimentiert werden, während sich die RNA im wässrigen Überstand befindet. 400 µl der oberen Phase wurden abgehoben, in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit der gleichen Menge an eiskaltem Isopropanol gemischt. In einer mindestens 15-minütigen Lagerungszeit bei -20 °C erfolgte die quantitative Fällung der RNA. Anschließend wurde die gefällte RNA für 10 min bei 4 °C bei 12000 g zentrifugiert. Man konnte nach der Zentrifugation beim Stängel ein weißes, bei Blatt und Wurzel ein bräunliches und bei den Blüten ein violettfarbenedes Pellet am Boden des Eppendorfgefäßes erkennen. Jedes RNA-Pellet wurde mit 500 µl 70%igem EtOH, anschließend mit 100%igem EtOH gewaschen und erneut zentrifugiert. Durch das Waschen mit Ethanol wurden Verunreinigungen, wie Salze oder Metallionen, entfernt. Es ist möglich, dass das Pellet auch erst nach dem Waschen mit Ethanol erscheinen kann. Nach zehnminütigem Trocknen bei 37 °C im Trockenschrank wurde das Pellet in 20 µl autoklaviertem Wasser bei 50 °C im Wasserbad gelöst.

Die RNA-Menge und deren Reinheit konnten durch ein Photometer bestimmt werden.

Anschließend wurden die Qualität der RNA sowie das Fehlen von DNA durch Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 2.1.6) bestimmt.

| |
|----------------------------|
| Lösung D |
| 4 M Guanidinthiocyanat |
| 25 mM Natriumcitrat pH 7,0 |
| 0,5% Lauroylsarcosin |

2.3.2 RNA-Isolierung aus Blättern, Blüten, Stängeln und Wurzeln nach Giuliano

Eine weitere Methode der RNA-Isolierung ist die Methode nach Giuliano (1993). Wie bei der oben beschriebenen Extraktion mussten sämtliche Geräte (Mörser, Spatel) und Lösungen doppelt autoklaviert oder alternativ zwei Stunden bei 200 °C „gebacken“ werden. In ein steriles, doppelt autoklaviertes 2 ml-Eppendorfgefäß wurden 500 µl Extraktionspuffer, 3,5 µl β-Mercaptoethanol und 400 µl Phenol vorgelegt. Das gefriergetrocknete Pflanzenmaterial wurde mit flüssigem Stickstoff fein gemörsert, und ca. 50 mg wurden zu der oben genannten Mischung gegeben. Es wurde intensiv gemischt und 100 µl Chloroform zugefügt. Man mischte erneut für 1-2 min, bis eine milchige Suspension erkennbar war. Nach einer 20-minütigen Inkubationsperiode auf Eis wurde für 20 min bei 16000 g und 4 °C zentrifugiert. Man gab 400 µl Überstand in ein neues 2 ml-Eppendorfgefäß und addierte die gleiche Menge an Isopropanol. Nach einer erneuten Inkubationsperiode auf Eis für 40 min wurde für 30 min bei

16000 g und 4 °C zentrifugiert. Das RNA-Pellet des Blattes war gelblich-grün, bei der Blüte war es rotbraun, bei dem Stängel weiß und bei der Wurzel intensiv braun gefärbt. Der Überstand konnte verworfen werden und das Pellet wurde bei 37 °C für mindestens 10 min getrocknet. Nach dem Trocknen löste man es durch einstündiges Inkubieren auf Eis in 500 µl TE-Puffer, wobei man öfter sanft mischte. Nach der Zugabe von 100 µl 96%igem EtOH wurde für 20 min auf Eis inkubiert, um eine Präzipitation der Polysaccharide zu erreichen. Es wurde erneut für 10 min bei 10000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues, doppelt autoklaviertes Eppendorfgefäß überführt und 200 µl 8 M LiCl addiert. Man inkubierte erneut für mindestens 90 min auf Eis, um eine RNA-Präzipitation zu erreichen. Nach dem Zentrifugationsschritt für 20 min bei 16000 g und 4 °C wurde das Pellet zweimal mit 70%igem EtOH gewaschen und bei 37 °C für ungefähr 10 min getrocknet. Die Blatt-RNA war hellbraun, die Blüten-RNA war dunkelgrün, die Stängel-RNA war weiß und die Wurzel-RNA war braun gefärbt. Die extrahierte RNA wurde in 50 µl sterilem Aqua dest. gelöst. Die RNA-Menge und deren Reinheit konnten durch ein Photometer verifiziert werden. Anschließend wurden die Qualität der RNA sowie das Fehlen von DNA durch Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 2.1.6) bestimmt.

2.3.3 Synthese von cDNA

Das Akronym cDNA steht für „complementary“-DNA oder copy-DNA. Seit 1970 ist bekannt, dass Retroviren mittels des Enzyms Reverse Transkriptase an einer RNA-Vorlage funktionstüchtige cDNA synthetisieren können (Mülhardt 2009).

Die cDNA Synthese wurde mit dem „Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit“ der Firma Fermentas (jetzt Thermo Fisher) durchgeführt.

Die zu verwendende RNA-Menge wurde so berechnet, dass eine Gesamtmenge von 1 µg Gesamt-RNA in der cDNA-Synthese eingesetzt werden konnte. Dieses RNA-Volumen wurde mit 1 µl oligo(dT)₁₈-Primern und sterilisiertem, demineralisiertem Wasser ad 12 µl versetzt. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und kurz zentrifugiert, damit sich alle Lösungen am Boden des Eppendorfgefäßes vereinigen konnten. Anschließend erhitze man den Ansatz für 5 min im Wasserbad bei 70 °C. Durch das Erwärmen können sich gebildete Sekundärstrukturen der RNA lösen, damit die Desoxythymidine der Primer leichter an den Poly-A-Schwanz der mRNA binden können. Nach dem Kühlen der Mischung auf Eis wurden folgende Lösungen pipettiert:

- 4 µl 5x Puffer
- 1 µl RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor (20 U/µl)
- 2 µl 10 mM dNTP Mix

Durch den RiboLock™ RNase Inhibitor werden die Aktivitäten von RNasen A, B und C nicht-kompetitiv gehemmt. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt, erneut zentrifugiert und anschließend für 5 min bei 37 °C inkubiert. Während der Inkubation kommt es zur Primeranlagerung an die mRNA.

Nach Zugabe von 1 µl RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/µl) wurde die Umschreibung von mRNA zu cDNA gestartet. Die Reaktion verlief während einer 60-minütigen Inkubation im Thermocycler bei 42 °C. Das Enzym RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase besitzt seine optimale Aktivität bei 42 °C und stammt aus dem Moloney-Murine-Leukemia-Virus. Nach Ablauf der Stunde wurde es durch Erhitzen auf 70 °C für 5 min im Wasserbad inaktiviert.

Die so erhaltene cDNA konnte direkt in einer Polymerase-Kettenreaktion (siehe Kapitel 2.3.4) eingesetzt werden.

2.3.4 Standard- und semiquantitative PCR

Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR), die 1985 von Saiki et al. entwickelt wurde, können kleine DNA-Stücke vervielfältigt werden. Die PCR beruht auf der Tatsache, dass ein grampositives, thermophiles Bakterium namens *Thermophilus aquaticus* eine thermostabile DNA-Polymerase (Taq-DNA-Polymerase) besitzt. Das Bakterium befindet sich z.B. in den 70 °C heißen Quellen und Geysiren im Yellowstone-Nationalpark (Brock und Freeze 1969). Die Taq-Polymerase weist ein Aktivitätsmaximum bei 74 °C und einen pH-Wert >8 auf. Neben der 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität besitzt sie auch eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität, aber keine 3'-5'-Exonukleaseaktivität. Die DNA-Syntheserate beträgt ca. 2800 Nukleotide/min (Mülhardt 2009).

Der PCR-Zyklus kann in drei Teile gegliedert werden:

Denaturierungsphase: Der Ansatz wird zuerst für 5 min auf 95 °C erhitzt, um die doppelsträngige Ausgangs-DNA („template“) in Einzelstränge zu trennen.

Annealingphase (Hybridisierungsphase): Hier erfolgt die Anlagerung der spezifischen Oligonukleotid-Primer an das template bei ihrer optimalen Temperatur. Die hierfür optimale Temperatur ergibt sich aus dem GC-Gehalt, dem Degenerationsgrad und der Sequenzhomologie der verwendeten Primer mit der zu amplifizierenden DNA.

Elongationsphase: Die Taq-Polymerase verknüpft ca. 2800 Basen/min in 5'→3'-Richtung bei einer optimalen Arbeitstemperatur von 72 °C. Die Menge des zu amplifizierenden Produkts verdoppelt sich bis zu dem Punkt, an dem ein Maximum erreicht ist, bei dem mehr Primer-Template-Komplexe vorliegen als die Polymerase in der Synthesezeit amplifizieren kann. Nach Konzentrationszunahme der neu synthetisierten Stränge hybridisieren diese immer häufiger miteinander. Die Amplifikationsrate sinkt signifikant mit zunehmender Zyklenzahl.

Für die PCR wird das GoTaq® Flexi DNA Polymerase Kit der Firma Promega verwendet.

Die Rezeptur lautet wie folgt:

| Zusammensetzung |
|--|
| 5 µl 5 × Colorless GoTaq® Flexi Buffer |
| 2,5 µl 25 mM MgCl ₂ |
| 0,5 µl 10 mM dNTPs |
| 0,5 µl cDNA |
| 0,5 µl 100 pmol/µl Primer-f |
| 0,5 µl 100 pmol/µl Primer-r |
| 0,1 µl GoTaq®-Polymerase (5 U/µl) |
| ad 25 µl frisch autoklaviertes Wasser |

Damit gewährleistet wurde, dass jeder PCR-Ansatz die gleiche Menge an template enthielt, wurde immer die RNA-Konzentration vor jeder Transkription bestimmt. 1 µg der RNA wurde anschließend mithilfe des „Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit“ in cDNA umgeschrieben. Um Pipettierungenauigkeiten auszugleichen, wurde jeweils ein Mastermix pipettiert. Zunächst wurden Wasser, Puffer und MgCl₂ zusammen gegeben. Dazu gab man die dNTPs, die Primer und die cDNA. Es wurde gut gemischt und zum Schluss die GoTaq® Polymerase hinzugefügt. Der komplette Ansatz wurde noch einmal gut gemischt, kurz zentrifugiert, auf Eis gestellt und anschließend auf die gewünschte Zahl an PCR-Reaktionen aliquotiert. Die PCR wurde in einem Eppendorf Mastercycler® gradient mit beheizbarem Deckel durchgeführt.

2.3.4.1 Standard-PCR

Das Expressionsmuster verschiedener Gene sollte in Blättern, Blüten, Stängeln und Wurzeln von *Glechoma hederacea* untersucht werden. Um das Temperaturoptimum einer RAS, einer HST und einer unbekannten HCT zu bestimmen, wurde eine Standard-PCR durchgeführt. Durch einen Temperaturgradienten mit folgenden Zwischenschritten: 50 °C, 54 °C, 58 °C, 62 °C und 66 °C wurde das jeweilige Temperaturoptimum für die Amplifikation der Hydroxycinnamoyltransferasen bestimmt.

| Temperatur (°C) | Zeit | Zyklen |
|-----------------|---------|--------|
| 94 | 2-5 min | 1 |
| 50/54/58/62/66 | 45 sec | |
| 72 | 3 min | |
| 94 | 30 sec | |

| | | |
|----------------|--------|----|
| 50/54/58/62/66 | 45 sec | 38 |
| 72 | 2 min | |
| 94 | 30 sec | 1 |
| 50/54/58/62/66 | 45 sec | |
| 72 | 10 min | |

Nach Beendigung des gewählten Programms wurden die Proben auf 6 °C gekühlt und danach mit der Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 2.1.6) untersucht.

2.3.4.2 Semiquantitative PCR

Um die optimale Zyklenzahl zu bestimmen, wurde eine semiquantitative PCR im Anschluss an die Determination der Temperaturoptima mit der Standard-PCR durchgeführt. Es wurden Proben einer RAS, einer HST, einer unbekannten HCT und eines house-keeping-Gens nach 28, 34 und 40 Zyklen (y) entnommen und bis zur Analyse über Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 2.1.6) bei 6 °C gelagert.

| Temperatur (°C) | Zeit | Zyklen |
|---|--------|--------|
| 94 | 5 min | 1 |
| HST (62); HCT (58); RAS (58); EF1α (62) | 45 sec | |
| 72 | 3 min | |
| 94 | 30 sec | y |
| HST (62); HCT (58); RAS (58); EF1α (62) | 45 sec | |
| 72 | 2 min | |
| 94 | 30 sec | 1 |
| HST (62); HCT (58); RAS (58); EF1α (62) | 45 sec | |
| 72 | 10 min | |

2.3.5 Untersuchung diverser „house-keeping“-Gene

Zahlreiche Techniken ermöglichen die Quantifizierung der mRNA: „RNase Protection Assay“, „Nuclease Protection Assay“ Northern Blot, Dot und Slot Blotting, semiquantitative und quantitative PCR (Thellin et al. 1999; Stürzenbaum und Kille 2001). Um intrinsische Variationen in verschiedenen Zellorganen, wie die Integrität der RNA, Lagerungsbedingungen, die Effizienz diverser Reagenzien bei der RNA-Extraktion, Aufreinigung, Reversen Transkription und bei der PCR auszugleichen, werden simultan sogenannte „house-keeping“-Gene als Kontrollen zur Verifizierung und Quantifizierung bei jeder PCR eingesetzt (Serazin-Leroy 1998; Setiawan und Lokman 2010).

2.3.5.1 18S-ribosomale RNA (18S-rRNA)

80% der Gesamt-RNA wird durch die ribosomale RNA repräsentiert. Die 18S-rRNA dient zum Aufbau der 40S-Untereinheit der eukaryotischen Ribosomen (Rettschlag 2003; Setiawan und Lokman 2010).

18S-rRNA wird als erstes Kontrollgen überprüft, ob es sich als Standard für die Untersuchungen der *Glechoma hederacea*-Pflanzen eignet. Es wurde eine Standard-PCR durchgeführt (siehe Kapitel 2.3.4.1).

| Primername | Sequenz (bp) | Schmelztemperatur (°C) |
|------------|----------------------------|------------------------|
| 18S for | 5'-AGGAATTGACGGCCAAACAC-3' | 57,3 |
| 18S rev | 5'-GCACATCTAAGGGCATCACA-3' | 57,3 |

2.3.5.2 β -Aktin

Weiterhin wurde zur indirekten Bestimmung der mRNA-Expression in Blättern, Stängeln und Wurzeln von *G. hederacea* ein 150 bp-Teilstück von β -Aktin als interner Standard bei 53-57 °C amplifiziert.

| Primername | Sequenz (bp) | Schmelztemperatur (°C) |
|------------|--------------------------------|------------------------|
| Aktin for | 5'-CTTATGTTGCCCTGGACTATGAGC-3' | 62,7 |
| Aktin rev | 5'-GGCAACGGAATCTCTCAGCTCC-3' | 64,0 |

Die PCR wurde mit folgenden Bedingungen durchgeführt (siehe Kapitel 2.3.4.1).

Da β -Aktin mit diesen Primern leider nicht amplifiziert werden konnte, wurden die β -Aktin-Nukleotidsequenzen von *Perilla frutescens* (AB002819.1), *Solenostemon scutellarioides* 1 (DQ423374.1), *Scutellaria baicalensis* (HQ847728.1), *Mentha arvensis* (HM359217.1),

Salvia miltiorrhiza 1 (DQ243702.1), *Solenostemon scutellarioides* 2 (EU019236.1), *Salvia miltiorrhiza* 2 (HM231319.1), *Salvia miltiorrhiza* 3 (HM051058.1), *Salvia officinalis* (FJ858193.1) aus der NCBI-Datenbank über MultAlign übereinander gelegt (siehe Abbildung 22). Die spezifischen, degenerierten Aktinprimer wurden konstruiert, wo die meisten Übereinstimmungen lagen. Es wurde eine Amplifikatgröße von ca. 313 bp erwartet.

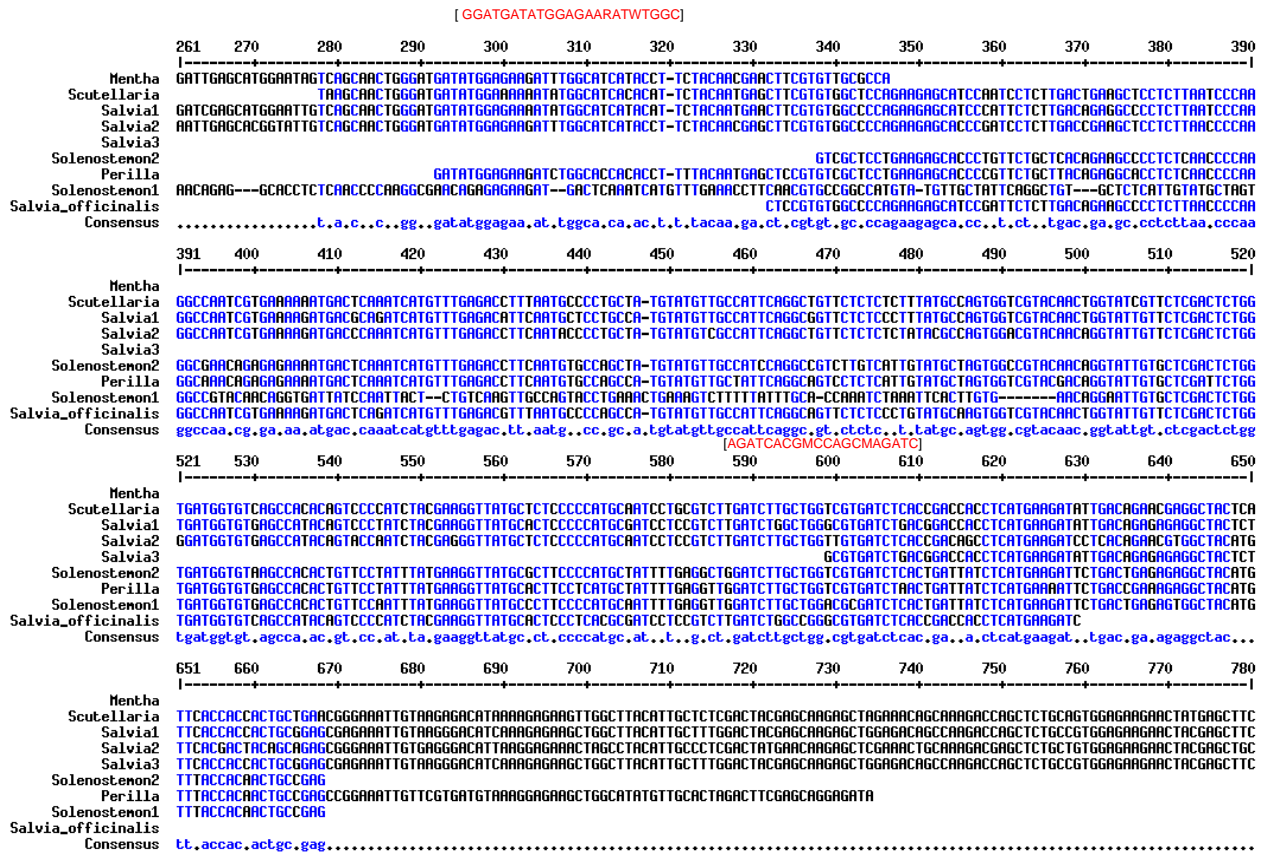


Abbildung 22: Alignment der β -Aktin-Nukleotidsequenzen von *Perilla frutescens* (AB002819.1), *Solenostemon scutellarioides* 1 (DQ423374.1), *Scutellaria baicalensis* (HQ847728.1), *Mentha arvensis* (HM359217.1), *Salvia miltiorrhiza* 1 (DQ243702.1), *Solenostemon scutellarioides* 2 (EU019236.1), *Salvia miltiorrhiza* 2 (HM231319.1), *Salvia miltiorrhiza* 3 (HM051058.1), *Salvia officinalis* (FJ858193.1)

| Primernamen | Sequenz (bp) | Schmelztemperatur (°C) |
|-------------|---------------------------------------|------------------------|
| LamAct-f | 5'-GGATGATATGGAGAA(G/A)AT(T/A)TGGC-3' | 58,0 |
| LamAct-r | 5'-AGATCACGMCCAGCMAGATC-3' | 59,4 |

2.3.5.3 Elongationsfaktor 1 α (EF1 α)

Da zu dieser Zeit noch keine Lamiaceae-Sequenzen der „house-keeping“-Gene von GAPDH, Ubiquitin und Tubulin in der NCBI-Datenbank existierten, wurden EF1 α -Lamiaceae-

Nukleotidsequenzen von *Scutellaria baicalensis* (HQ694771.1), *Origanum vulgare* (GU385981.1), *Plantago major* (AM111324.1), *Striga asiatica* (DQ442392.1), *Avicennia marina* (AB106676.1), *Phelipanche racemosa* (HM219554.1), *Forsythia x racemosa* (X97131.1) und *Salvia officinalis* (FJ858191.1) in MultAlign übereinandergelegt, um spezielle degenerierte Primer zu entwerfen (siehe Abbildung 23).

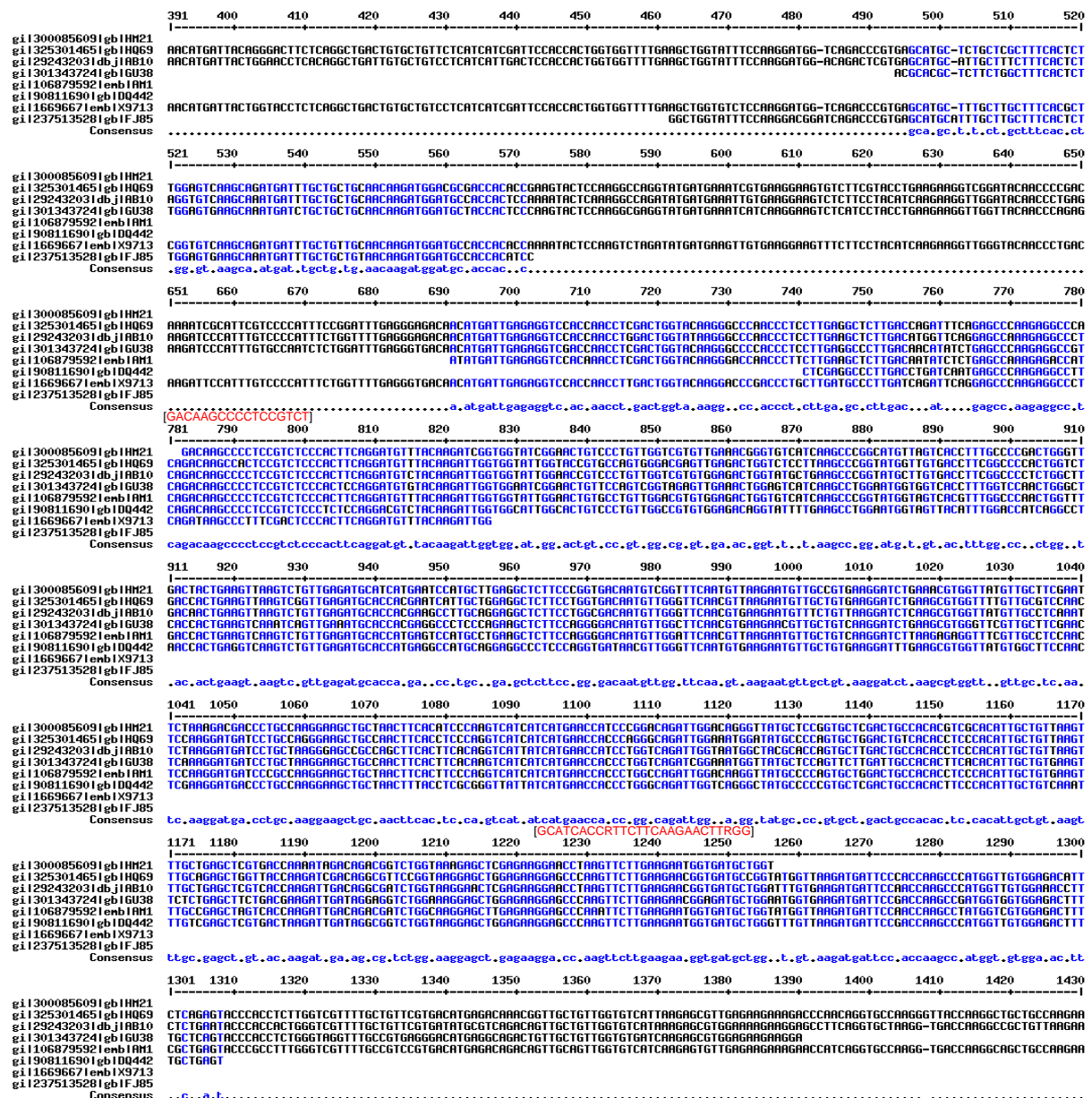


Abbildung 23: Alignment der EF1 α -Lamiales-Nukleotidsequenzen von *Scutellaria baicalensis* (HQ694771.1), *Origanum vulgare* (GU385981.1), *Plantago major* (AM111324.1), *Striga asiatica* (DQ442392.1), *Avicennia marina* (AB106676.1), *Phelipanche racemosa* (HM219554.1), *Forsythia x racemosa* (X97131.1) und *Salvia officinalis* (FJ858191.1)

| Primername | Sequenz (bp) | Schmelztemperatur (°C) |
|-----------------|-----------------------------------|------------------------|
| EF1 α -f | 5'-GACAAGCCCCTCCGTCTCCCAC-3' | 67,7 |
| EF1 α -r | 5'-GCATCACCR TTCTTCAAGAACTTRGG-3' | 63,2 |

2.3.6 Expressionsstudien zu Hydroxycinnamoyltransferasen aus Blättern, Blüten, Stängeln und Wurzeln

Es wurde RNA aus gereinigten Blättern, Blüten, Stängeln und Wurzeln von *Glechoma hederacea* extrahiert (siehe Kapitel 2.3.1) und in cDNA umgeschrieben (siehe Kapitel 2.3.3) und ein semiquantitativer PCR-Ansatz mit 1 μ l cDNA und je 0,5 μ l Primern verwendet (siehe 2.3.4.2), um die Expression der HST, der RAS, der unbekannten HCT und des Standards EF1 α zu untersuchen.

Nach Beendigung des gewählten Programms wurden die Proben auf 6 °C gekühlt. Die PCR-Proben wurden direkt mithilfe der Agarosegelelektrophorese analysiert.

| Primername | Sequenz (bp) | Schmelztemperatur (°C) |
|------------|---|------------------------|
| Gh-RAS-f | 5'-GACAAGCCCCTCCGTCTCCCAC-3' | 63,4 |
| Gh-RAS-r | 5'-AATTGTCGACTTAAATCTCATAAAACAAC TTCTC-3' | 62,2 |
| Gh-HST-f | 5'-ATGAAAATCGAGGTGAGAGACTCGACGCT-3' | 66,7 |
| Gh-HST-r | 5'-TCAAATATCATAGAGCAGCTTCTC-3' | 57,6 |
| Gh-HCT-f | 5'-ATGAAGATGAGTGTGAAGGAGTCA-3' | 59,3 |
| Gh-HCT-r | 5'-TCAAATATCATAAAGCAGCTTCTCA-3' | 56,4 |

2.3.7 Extraktion von Chlorogen-, Kaffee- und Rosmarinsäure aus Blättern, Blüten, Stängeln und Wurzeln

Nach dem Lagern der verschiedenen *Glechoma hederacea*-Pflanzenorgane bei -80 °C und dem Gefriertrocknen für 16 h wurde das Pflanzenmaterial fein gemörstert. Es wurden 10 mg der fein gemörsterten Zellen mit 1 ml 70%igem EtOH versetzt und intensiv suspendiert. Danach wurden die Zellen im Ultraschallbad bei 70 °C für 10 min beschallt. Nach wiederholtem Resuspendieren wurde die Extraktion im Ultraschallbad wiederholt, erneut gemischt und bei 3000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde 1:10 mit 40% MeOH/0,01% H₃PO₄ verdünnt und über HPLC analysiert.

2.3.8 Versuche zur Isolierung einer Lamiaceae-HQT

2.3.8.1 Entwurf von HQT-Primern mithilfe des Programms CLC-Sequence Viewer

Um die HQT-Sequenz aus *G. hederacea* zu isolieren, wurden HQT-Nukleotidsequenzen von *Solanum lycopersicum* (AJ582652.1), *Nicotiana tabacum* (AJ582651.1) und *Cynara cardunculus* (DQ915589.1) im CLC-Sequence-Viewer zur Identifizierung konservierter Nukleotidbereiche übereinandergelegt. Durch Vergleichen mit den bekannten langen und kurzen HST- und RAS-Sequenzen aus *Glechoma* (Sander 2010) konnten die Unterschiede bestimmt und aus den konservierten Regionen zwei Primer identifiziert werden (siehe Abbildung 24).

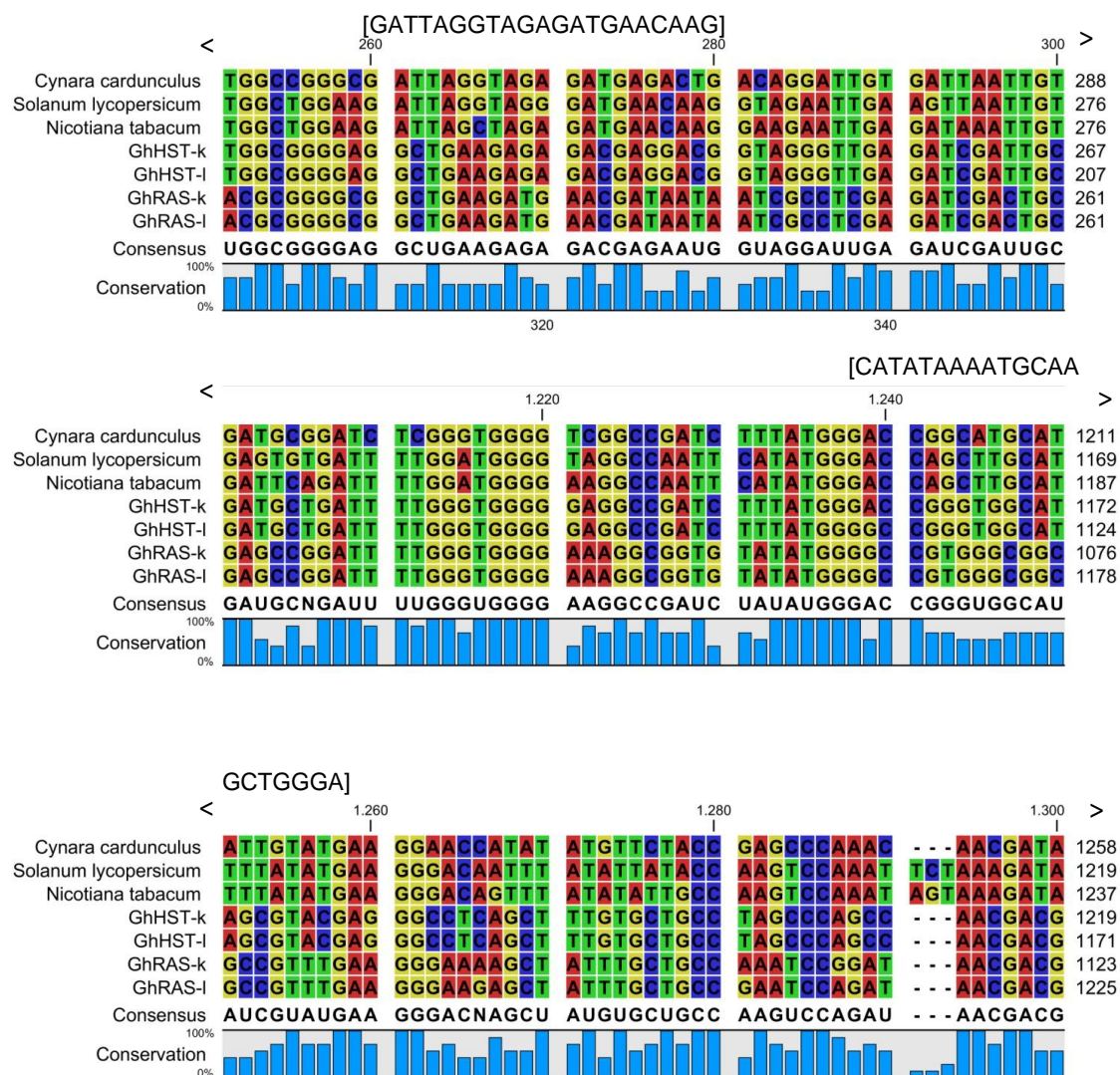


Abbildung 24: Alignment der HQT-Sequenzen von *Solanum lycopersicum* (AJ582652.1), *Nicotiana tabacum* (AJ582651.1) und *Cynara cardunculus* (DQ915589.1) mit den kurzen und langen HST (HG423392, HG423393)- und den kurzen und langen RAS-Sequenzen (HG423394, HG423395) aus *Glechoma hederacea*

| Primername | Sequenz (bp) | Schmelztemperatur (°C) |
|------------|------------------------------|------------------------|
| HQT-f | 5'-GATTAGGTAGAGATGAACAAG -3' | 54,9 |
| HQT-r | 5'-CATATAAAATGCAAGCTGGGA -3' | 51,1 |

Es wurde eine Standard-PCR (siehe Kapitel 2.3.4.1) bei 47, 49, 52 und 55 °C durchgeführt, um ein 980 bp langes Amplifikat zu erzielen. Die Überprüfung der Funktionsfähigkeit der Primer wurde mit cDNA aus Blüten von *Nicotiana tabacum* durchgeführt.

2.3.8.2 Isolierung von genomischer DNA aus Blättern

Die genomische DNA (gDNA) repräsentiert das komplette Genom, also alle Gene eines Organismus. Bei höheren Organismen befindet sich die genomische DNA im Zellkern, in den Plastiden und Mitochondrien (Mülhardt 2009). Bei Eukaryoten kann sie in kodierende (Exons) und nichtkodierende (Introns) Bereiche unterteilt werden. Durch Spleißen (Entfernung der Introns) und weitere posttranskriptionale Veränderungen entsteht aus der prä-mRNA die fertige mRNA. Die Menge an Gesamt-DNA der Kerngenome von Samenpflanzen reichen von 125 Megabasenpaaren (Mbp) bei *Arabidopsis* zu 30000 Mbp bei einigen Liliaceae (Sitte et al. 2002).

Zur Isolierung von genomischer DNA wurde die Methode von Rogers und Bendich (1985) angewandt.

Das verlesene und gereinigte Pflanzenmaterial von *Glechoma hederacea* wurde in einem mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser fein zermahlen. 200 mg des pulverisierten Materials wurden in 1,5 ml-Eppendorfgefäße überführt, in denen sich 300 µl 2× CTAB-Puffer (65 °C) befanden. Nach Inkubation bei 65 °C für 20 min mit mehrmaligem Mischen wurde 30 min auf Eis inkubiert. Man gab 300 µl Chloroform hinzu und mischte sorgfältig. Das chaotrope Salz CTAB ist ein Akronym für Cetyltrimethylammoniumbromid. Es bildet Komplexe mit Proteinen und Polysacchariden, erstere werden durch Chloroform extrahiert. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 13000 g wurde die obere Phase abgehoben und in ein neues Eppendorfgefäß, in dem sich 30 µl auf 65 °C temperierter 10× CTAB-Puffer befanden, überführt. Nach Zugabe von 300 µl Chloroform, Schütteln und einer weiteren Zentrifugation bei vorherigen Bedingungen wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und in neue 1,5 ml- Reaktionsgefäße überführt, in welchen sich 250 µl CTAB-Präzipitationspuffer befanden. Nach intensivem Suspendieren wurde bei 13000 g für 10 min zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstands ist das Präzipitat oft nur als schwacher Film erkennbar. Es wurde in 200 µl High Salt TE resuspendiert, nach Zugabe von 400 µl Ethanol p.a. (99%) gemischt und die DNA bei -20 °C für mindestens 15 min gefällt. Nach einem Zentrifugationsschritt (15 min, 13000 g) war ein diffuser, weißer Niederschlag sichtbar. Dieser wurde zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und dann bei 37 °C im Trockenschrank für 5-10 min getrocknet. Bei einer zu intensiven Trocknungsperiode ist die gDNA schwer wieder in Lösung zu bringen. Das Pellet

wurde in 30 µl autoklaviertem Wasser oder 30 µl 0,1 M TE-Puffer und 0,3 µl RNase für 30 min bei 37 °C gelöst. Mit der gewonnenen gDNA wurde eine Standard-PCR (siehe Kapitel 2.3.4.1) bei 47, 49, 52 und 55 °C durchgeführt.

| |
|------------------------------|
| 2x CTAB-Puffer |
| CTAB 2% (m/v) |
| Tris/HCl 100 mM pH 8,0 |
| EDTA 20 mM pH 8,0 |
| NaCl 1,4 M |
| Polyvinylpyrrolidon 1% (m/v) |

| |
|------------------------|
| 10x CTAB-Puffer |
| CTAB 10% (m/v) |
| NaCl 0,7 M |

| |
|----------------------------|
| High Salt TE-Puffer |
| Tris/HCl pH 8,0 10 mM |
| EDTA pH 8,0 1 mM |
| NaCl 1 M |

| |
|----------------------------------|
| CTAB-Präzipitationspuffer |
| CTAB 1% (m/v) |
| Tris/HCl pH 8,0 50 mM |
| EDTA pH 8,0 10 mM |

2.3.8.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Durch das NucleoSpin®-Extract II Kit kann DNA isoliert und gleichzeitig gereinigt werden.

Die identifizierte(n) DNA-Bande(n) wurde(n) unter UV-Licht ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß gegeben. Dabei war darauf zu achten, dass die UV-Exposition möglichst gering gehalten wird. Durch zu intensive UV-Exposition kann es zu Depurinierung oder zur Bildung von Pyrimidindimeren oder Strangbrüchen kommen (Mülhardt 2009). Das Gelstück wurde in ein 2 ml-Eppendorfgefäß überführt, das Gel-Gewicht bestimmt und mit der doppelten Menge an NT-Puffer versetzt. Durch das Erwärmen auf 50 °C für 10 min wurde die Agarosegelmatrix verflüssigt. Nach intensivem Durchmischen gab man die Lösung auf ein NucleoSpin-Säulchen und zentrifugierte 1 min bei 11000 g. Der Durchfluss wurde als ethidiumbromidhaltiger Abfall entsorgt. Nach Zugabe von 600 µl NT3-Puffer auf das Säulchen wurde bei den vorherigen Bedingungen (s.o.) zentrifugiert. Nach diesem Zentrifugationsschritt schloss sich ein weiterer Zentrifugationsschritt für 2 min bei 11000 g an, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen. Um die adsorbierte DNA von der Silikatmembran zu lösen, gab man 20 µl (2x 10 µl) autoklaviertes Aqua dest. auf das Säulchen und inkubierte für 1 min. Die extrahierte DNA wurde durch Zentrifugation unter den genannten Bedingungen in ein neues, autoklaviertes 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt.

2.3.8.4 Ligation in pDrive®-Vektor

Plasmide sind kleine, ringförmige DNA-Moleküle, die in Bakterien neben dem Chromosom vorliegen. Mit deren Hilfe können nützliche Gene von Bakterium zu Bakterium weitergegeben werden. Ihre Vermehrung erfolgt autonom, d.h. unabhängig vom Bakterienchromosom, da sie einen eigenen Replikationsursprung (origin of replication) aufweisen. Außerdem besitzen sie ein Selektionsgen (Ampicillin-, Kanamycinresistenz) und eine Klonierungsstelle (cloning site), um fremde DNA in das Plasmid einbringen zu können (Mülhardt 2009).

Das Qiagen-PCR-Klonierungskit macht sich den durch die Taq-Polymerase eingeführten Desoxyadenosinüberhang zunutze, da sie keine glatten, sondern überhängende Enden schafft. Der pDrive®-Klonierungsvektor ist in seiner linearen Form mit einem U-Überhang an jedem Ende ausgestattet und hybridisiert mit den entsprechenden PCR-Produkten. Durch die Zusammensetzung des Puffers im Ligations-Master-Mix ist eine optimale Bedingung für eine schnelle und effiziente Ligation geschaffen (Angaben des Herstellers).

| |
|--------------------------------------|
| Ligationsansatz |
| 0,5 µl pDrive®-Cloning Vektor |
| 2 µl PCR-Produkt |
| 2,5 µl Ligation Master Mix 2 x |
| Ligation erfolgt über Nacht bei 4 °C |

2.3.8.5 Transformation von chemokompetenten EZ-Zellen

Um die DNA aus dem umgebenden Medium aufnehmen zu können, werden kompetente Zellen benötigt.

Zunächst wurden LB-Agar-Platten präpariert: Nach Verflüssigung von 250 ml LB-Agar-Medium gab man die entsprechende Menge Ampicillin (1250 µl 20 mg/ml Ampicillin auf 250 ml Medium), 0,1 M IPTG (50 µl, Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) und X-Gal (160 µl, 50 mg/ml X-Gal = 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl-β-D-Galactopyranosid in autosterilem Dimethylformamid) hinzu, um eine Blau-Weiß-Selektion zu erzielen. Ampicillin verhindert das Wachstum derjenigen Bakterien, die keinen Vektor aufgenommen haben, da diese nicht Ampicillin-resistent sind.

Die Klonierungsstelle des Vektors kann in einem Gen liegen, das nach dem Klonieren eines DNA-Fragments in das Plasmid inaktiviert wird. Dies macht man sich bei der Blau-Weiß-Selektion zunutze, die auf einer Unterbrechung des lacZ'-Gens beruht. Dieses Gen kodiert für das N-terminale α-Fragment der β-Galactosidase, die jedoch keine β-Galactosidase-Aktivität aufweist. Die α-Komplementation beschreibt die Wiederherstellung der Aktivität durch das ebenfalls inaktive, C-terminale ω-Fragment des Bakterienstamms. Bakterienkolonien, bei denen das lacZ'-Gen durch die Insertion eines DNA-Fragments unterbrochen ist, bleiben nach der Inkubation mit dem Induktor IPTG und X-Gal weiß (positive Klone), wohingegen die Klone ohne Insert die β-Galactosidase exprimieren und X-Gal zu Indigo umwandeln (blaue Klone). Der erste Schritt beinhaltet die Hydrolyse des X-Gals zu Galactose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl durch die β-Galactosidase. Als Nächstes erfolgt die Oxidation mit Luftsauerstoff und die Dimerisierung zu 5,5'-Dibrom-4,4'-Dichlorindigo, welche sich erst nach 1-2 Stunden bei 4 °C entwickelt (Mülhardt 2009).

EZ-Zellen sind durch das hinzugefügte CaCl₂ extrem empfindlich. Deshalb sollten sie auf Eis auftauen, was ungefähr 5 min dauerte. Nach Zugabe des Ligationsansatzes (5 µl) mischte man behutsam und inkubierte für 5 min auf Eis. Dann wurde bei 42 °C im Wasserbad für 30 Sekunden die Zellwand „durchlöchert“. Um den Bakterien eine „Erholungsphase“ zu schaffen, wurde auf Eis für 2 min inkubiert und 250 µl temperiertes SOC-Medium (siehe Kapitel 7.3.2) dazu gegeben. Um die Ausbildung der Ampicillinresistenz zu ermöglichen, inkubierte man 30-45 min bei 220 UpM bei 37 °C. Nach Ablauf dieser Periode verteilte man den kompletten Inhalt des Eppendorfgefäßes auf die vorbereiteten Platten und inkubierte 16 h bei 37 °C. Der Einbau des Inserts ließ sich durch Plasmidpräparation aus einer ÜN-Kultur (siehe 2.1.4), anschließendem Restriktionsverdau (siehe Kapitel 2.3.8.6) und Kontrolle durch Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 2.1.6) überprüfen.

2.3.8.6 Restriktionsverdau mit *EcoRI*

Um die Kolonien zu bestimmen, die den pET-Vektor mit ligiertem Plasmid tragen, wurde ein Verdau durchgeführt.

| |
|--------------------------------|
| Verdau |
| 1,5 µl <i>EcoRI</i> 10x Puffer |
| 5 µl Plasmid |
| 0,5 µl <i>EcoRI</i> (10 U/µl) |
| 8 µl Aqua dest. (autoklaviert) |

Der Ansatz wurde für mindestens 3 h bei 37 °C im Trockenschrank inkubiert, bevor er über ein Agarosegel (siehe Kapitel 2.1.6) analysiert wurde.

2.3.8.7 Entwurf von HQT-Primern mit dem CODEHOP-Programm

Um unbekannte Mitglieder einer Genfamilie durch PCR zu isolieren, werden meist degenerierte Primer benutzt. Diese enthalten einen Primerpool aller möglichen Nukleotidsequenzen, welche für ein konserviertes Motiv kodieren. Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung von Konsensusprimern, welche das am häufigsten auftretende Nukleotid an jeder Kodonposition innerhalb des Motivs enthalten (Rose et al. 2003). Um die Mankos beider Methoden auszugleichen, wurde ein neues Konzept entwickelt, welches beide Ansätze kombiniert (Staheli et al. 2011).

Das Akronym CODEHOP (Consensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) ist ein interaktives Programm (<http://blocks.fhcrc.org/codehop.html>), um unbekannte oder entfernt verwandte Gensequenzen zu detektieren. Kurze, hochkonservierte Regionen der Proteine können als lückenloser Block der übereinandergelegten Proteinsequenzen dargestellt werden. Die CODEHOP-Primer werden von diesen hochkonservierten Sequenzblocks abgeleitet. In Abbildung 25 zeigt das Sequenz-Logo die konservierten AS. Die Höhe jeder AS ist proportional zum Konservierungsgrad. Der Primer ist gegen das hoch konservierte „PCQG“-Motiv gerichtet. Die degenerierte 3′-„core“-Region enthält alle möglichen Nukleotidsequenzen, die für das „PCQG“-Motiv kodieren. Die 5′-„consensus-clamp“-Region enthält in jeder Position das wahrscheinlichste Nukleotid, welches das „PCQG“-Motiv flankiert (Rose et al. 2003).

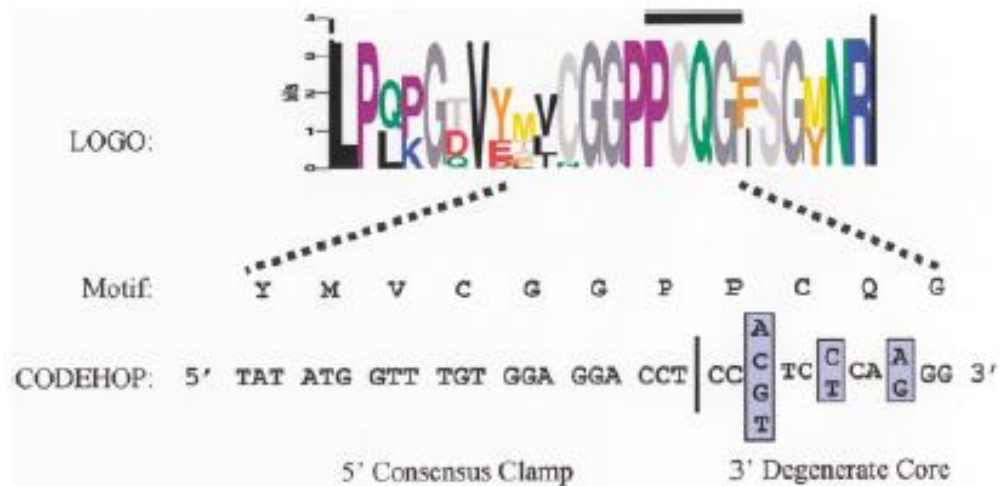


Abbildung 25: Aufbau eines CODEHOP-PCR-Primers aus Rose et al. 2003

Folgende Strategie liegt dem Prinzip zugrunde (siehe Abbildung 26): Der CODEHOP-Primer ist gegen das konservierte Motiv aus 3-4 AS gerichtet, da er über eine degenerierte 3'-„core“-Region verfügt, welche alle möglichen Sequenzen, die für das Motiv kodieren, enthält. Die Annealingphase der degenerierten „core“-Region an das template wird durch die 5'-„consensus-clamp“-Region stabilisiert. Während der verschiedenen Amplifikationszyklen wird das Hybridisieren der Primer an das PCR-Produkt dadurch ermöglicht, dass die 5'-„consensus-clamp“-Region identisch mit dem eingebauten Primer sowie dem verbliebenen Primer ist (Rose et al. 2003).

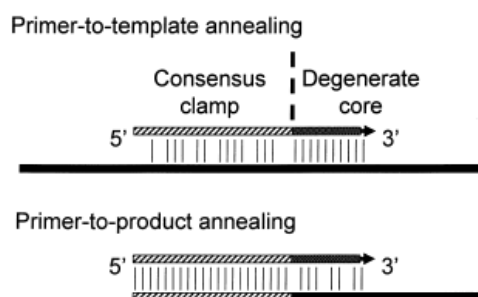


Abbildung 26: CODEHOP-PCR-Prinzip (Rose et al. 2003)

Es wurden Primer aus den lückenlosen Blocks ausgewählt, welche wenig „Wobbles“ (verschiedene Basenmöglichkeiten innerhalb einer Position) sowie einen geringen Degenerierungsgrad aufwiesen (siehe Abbildung 27).

- HQT-hop-f: GCTCTGTCTAATGTTCTGGTTTCTTTTayccnatggc -3' Core: degen=8 len=11 Clamp: score=72, len=27 temp= 62.4
(AS-Sequenz: **ALSNVLVSFYPMAGRLGRDEQGRIE**)
- HQT-hop-r: 5'-GCAGACCTCTAGCCTTACAAGTACATckccadatrtg-3'
degen=12 temp=62.0
(AS-Sequenz: **HIWRCTCKARGLP**)

Eine Standard-PCR (siehe Kapitel 2.3.4.1) wurde durchgeführt. Es wurde eine Amplifikatgröße von 642 bp erwartet und ein Temperaturgradient von 57, 60 und 63 °C angelegt. Die Funktionsfähigkeit der Primer wurde mit cDNA aus *Nicotiana tabacum*-Blüten überprüft.

Da kein HQT-Gen in *Glechoma* detektiert werden konnte, wurden aus den Blocks noch einmal andere Primer bestimmt (siehe Abbildung 27).

- HQT-hope-f: AGCTGAATCTGATTCTTGTGTTgaygaytygg -3' Core: degen=8 len=11 Clamp: score=68, len=22 temp= 60.3
(AS-Sequenz: **VLFEVAESDSCVDDFGDFTPSPEFRKLIPSVSYS**)
- HQT-hope-r: 5'-AATATAAATAGTTCCTTCATACAGAATACAAgcnngncccat-3'
degen=16 temp=60.2
(AS-Sequenz: **MGPACILYEGTIYI**)

Bei den an zweiter Stelle genannten Codehop-Primern wurde eine Amplifikatgröße von 834 bp erwartet und ebenfalls ein Temperaturgradient von 57, 60 und 63 °C angelegt. Die Funktionsfähigkeit der Primer wurde mit cDNA aus Blüten von *Nicotiana tabacum* überprüft.

Da diese Strategie ebenfalls nicht zum Erfolg führte, wurden nun dieselben Primer eingesetzt, die zur Detektion einer HCSQT (DQ104740.1) aus *Cynara cardunculus* geführt hatten (Comino et al. 2007).

| Primername | Sequenz (bp) | Schmelztemperatur (°C) |
|------------|----------------------------|------------------------|
| COD1-f | 5'-TTTTATCCNATGGCNGGDMG-3' | 57,0 |
| COD1-r | 5'-AACGTTHCCRAARTANCC-3' | 51,0 |

COD1-f: AS-Sequenz: **FYPMGGR**

COD1-r: AS-Sequenz: **GYFGNV**

Nita MGSEK--MMKINIKESTLVKPSKPPTP--TKRLWSSNLDLIVGRIHLLTVYFYKPNGSSNF 56
Lyes MGSEK--MMKINIKESTLVKPSKPPTP--TKRIWSSNLDLIVGRIHLLTVYFYKPNGSSNF 56
Cyca MGSQDKMMMNIDIMKSSI VPPSELIADCPQLWTSNLDLVVGRIHILT VYFYPNGSSKF 60
.: **.* :*: * **: . .*: *:**:*****:*****:*****:*

Nita FDSKIMKEALS NVLVS FYPMAGELARDEQGRIEINCNGEGVLVFEAESDAFVDDFGDFTPT 116
Lyes FDNKVIKEALSNVLVSFYPMAGRLGRDEQGRIEVNCNGEGVLVFEAESDCVDFFGDFTPT 116
Cyca FDPNVMKKALADVLSFYPMAGRLGRDETDRIVINCNEGVLVFEAESDSTLDDFGELKE 120
** :*: *.**: *****.*** **. :*. *****: :****:.*

Nita SLELRKLIPTVDTSGDISTFPLIIFQVTRFKCGGVSLGGGVFHHTLSDDLSSIHFIN TWSD 176
Lyes SLELRKLIPSVETSGDISTFPLVIFQITRFKCGGVSLGGGVFHHTLSDDLSSIHFIN TWSD 176
Cyca SPVFERQLTPSVDSGDISSYPFLFAQVTHFKCGGVSLGCGVFHHHTLSDDLSSLHFINT WSD 180
* :*: *.**: *****:***: *.*: *****.* *. ***** :*****

Nita IARGLSVAIPPFI DRTLRLRARDPPTSSFEHVEYHPPPSLISSSKSLESTSPKPSTTTMLK 236
Lyes IARGLSVAVPPFI DRTLRLRARDPPTYSEHVEYHPPPTLNSS-KNRES-----STT TMLK 230
Cyca MARGLSVAIPPFIERTLLRAREPPTPTYDHVEYHSPPSMNTTAQKPGSGSLKSSTTMLK 240
:*****.***:*****:*** ::*****.*: :. . * *:*****

Nita FSSDQLGLLKS KSKHDG---STYEILAAHIWRCTCKARALSD DQLTKLHVATDGRSRLC 292
Lyes FSSEQ LGLLKS KSKNEG---STYEILAAHIWRCTCKARGLPE DQLTKLHVATDGRSRLC 286
Cyca LTL DQLNSLKAKAKESGSGSTHSTYEILAAHIWRCAKARGLPDDQLSKLY VATDGRSRLS 300
:: :*. **.*: . *****:*****.*: ***:**:*****.

Nita PPLPPCYLGNNVFTGT PMAKSELLQEPLTNSAKRIHSALS KMDDNYLRSA LDYLELLPD 352
Lyes PPLPPGYLGNNVFTATPI AKSCELQSEPLTNSVKRIHNELIKMD DDNYLRSA LDYLELQPD 346
Cyca PRLPPGYLGNNVFTATPVAKSGDLT SKSLSENTAKLIHTLT KMDDDYLRSA IDYLESQPD 360
* *****.*:*** :* .:.*:..* *. * *****:*****:***** **

Nita LSALIRGP TYFASPNLNINSWTRL PVHDSDFGWGRPIHMGPACIL YEGTYI LPSPNSKD 412
Lyes LSTLIRGPAYFASPNLNINSWTRL PVHECDFGWGRPIHMGPACIL YEGTIYI IPSPNSKD 406
Cyca LSALIRGPSYFASPNLNINAWTRL PVYDALDGWG RPIFMGPACIL YEGTIYI VPSPNN-D 419
*: *****:*****:*****:..*: *****. *****:*.***** *

Nita RNRLAVCLDADAHMPLFEKYLYEF 436
Lyes RNRLAVCLDAGHMSLF EKYLYEL 430
Cyca RSVSLAVCLDANEQPLFEKFLYEF 443
*: *****. *****:*****:

AS; Punkte (.,.) zeigen an, dass AS

Bei den letztgenannten Codehop-Primern wurde eine Amplifikatgröße von 720 bp erwartet,

2.3.8.8 Amplifikation des HQT-Mittelstücks

~ 68 ~

bedingungen in den pDrive®-Vektor ligiert (2.3.8.4). Mithilfe des PCR-Cloning-Handbuchs von Qiagen wurde die optimale Menge an PCR-Produkt berechnet, die eingesetzt werden muss, um das bestmögliche Ergebnis zu erzielen. Nach der Transformation von kompetenten EZ-Zellen (siehe Kapitel 2.3.8.5) und Blau-Weiß-Selektion wurden 16 Kolonien gepickt. Am folgenden Tag wurde aus den ÜN-Kulturen (siehe Kapitel 2.1.3) eine Plasmidpräparation angefertigt (siehe Kapitel 2.1.4), die für 4 h bei 37 °C einem Restriktionsverdau unter Standardbedingungen und einer Agarosegelelektrophorese unterzogen wurde (siehe 2.3.8.6). 20 µl der Plasmide, die ein Insert aufwiesen, wurden zur Sequenzanalyse zu Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) geschickt.

Es wurde die Sequenz des Mittelstücks ermittelt und aus dieser die Primer für die RACE-PCR abgeleitet.

| Primername | Sequenz (bp) | Schmelztemperatur (°C) |
|---------------------|---|------------------------|
| RACE-Q _T | 5'-CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3' | 73,4 |
| RACE-Q _o | 5'-CCAGTGAGCAGAGTGACG-3' | 58,2 |
| RACE-Q _i | 5'-GAGGACTCGAGCTCAAGC-3' | 58,2 |
| HQT-3'GSP1 | 5'-CGATTTGCCCCCAATTTGGAC-3' | 62,1 |
| HQT-3'GSP2 | 5'-ATTTGACCTACGCGCTTCTCG-3' | 62,1 |
| HQT-GPRT | 5'-AGGTGACCGTATTGCCATCCTC-3' | 62,1 |
| HQT-5'GSP1 | 5'-GTGAAGCCCGGAAAAACCATCG-3' | 62,1 |
| HQT-5'GSP2 | 5'-TTCCGACGCCTAAGGAAACTCC-3' | 62,1 |

2.3.8.9 Amplifikation des 3'-Endes mittels RACE-PCR

Die Vollängen-cDNA eines bestimmten Gens kann aus einer komplexen Mischung zellulärer mRNA durch Verwendung der RACE-PCR (rapid amplification of cDNA-ends with polymerase chain reaction) erhalten werden. Die RACE-PCR wird auch als „anchored“-PCR bezeichnet. Bei der 3'-RACE führt man die cDNA-Synthese mit einem modifizierten oligo(dT)-Primer (Ankerprimer) durch, dessen 5'-Hälfte aus einer zusätzlichen, speziell konstruierten Sequenz besteht. Die cDNA amplifiziert man mithilfe eines transkript- und eines ankerspezifischen Primers. Die darauf folgende PCR wird als „nested“-PCR bezeichnet (Mülhardt 2009). Bei der cDNA-Synthese für eine 3'-RACE-PCR wird die mRNA mithilfe des Q_T-Primers revers transkribiert (siehe Abbildung 28). Er besteht aus 52 Nukleotiden (5'-Q_o-Q_i-TTT-3') und enthält eine oligo(dT)-Sequenz aus 17 Nukleotiden am 3'-Ende, gefolgt von 35 Nukleotidsequenzen, welche für *Hind*III-, *Sst*I- und *Yho*I-Erkennungsstellen kodieren. Das 3'-Ende wird mit dem Q_o-Primer (Q_o = Q_{outer}) amplifiziert. Dieser bindet an die cDNA am 3'-Ende. Außerdem wird noch ein Primer benötigt, der mit dem Zielgen hybridisiert (GSP1 =

gene-specific primer). Die zweite PCR wird mithilfe des Q_i -Primers ($Q_i = Q_{inner}$) und des GSP2-Primers durchgeführt, um die Amplifikation unspezifischer Produkte zu minimieren.

Die 3'-RACE-PCR wurde leicht abgewandelt, wie von Scotto-Lavino et al. (2006a) beschrieben, durchgeführt.

Die cDNA wurde mit dem „Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit“ folgendermaßen synthetisiert:

cDNA-Synthese

- x μ l RNA-Präparation (5 μ g)
- x μ l Wasser (Gesamtvolumen: 11,5 μ l)

5 min im Wasserbad bei 70 °C erhitzen, sofort auf Eis stellen, kurz zentrifugieren und auf Eis lagern

Zugabe von:

- 4 μ l 5x-Puffer
- 0,5 μ l Q_T -Primer (100 ng/ μ l)
- 1 μ l RNase-Inhibitor
- 2 μ l 10 mM dNTPs

Inkubation für 5 min bei 25 °C, Zugabe von 1 μ l Reverser Transkriptase, Inkubation für 60 min bei 42 °C und anschließend für 10 min bei 50 °C, Inaktivierung der Reversen Transkriptase für 15 min bei 70 °C, kurz zentrifugieren, auf Eis lagern

Abbau der RNA

- 0,75 μ l (1,5 U) RNase H

Inkubation für 20 min bei 37 °C

Verdünnung der cDNA

Zugabe von 80 μ l Tris-EDTA (TE)-Puffer (1:5-Verdünnung)

Erste PCR

- 5 μ l 5x True Start Taq Buffer (10x)
- 3 μ l 25 mM $MgCl_2$
- 1 μ l 10 mM dNTPs (10 mM)
- 1 μ l 3'-cDNA (1:5-Verdünnung)

Material und Methoden

2,5 µl Q_o-Primer (10 µM)

2,5 µl 3'-GSP1-Primer (10 µM)

0,5 µl TrueStart™ Taq-Polymerase (5 U/µl)

34,5 µl frisch autoklaviertes Wasser

| Temperatur (°C) | Zeit | Zyklen |
|-------------------|--------|--------|
| 95 | 5 min | 1 |
| 53, 55, 57 | 2 min | |
| 72 | 40 min | |
| 94 | 30 sec | 30 |
| 53, 55, 57 | 30 sec | |
| 72 | 3 min | |
| 94 | 30 sec | 1 |
| 53, 55, 57 | 30 sec | |
| 72 | 15 min | |
| Abkühlen auf 6 °C | | |

Je 5 µl der Reaktionsansätze der ersten PCR wurden mit 95 µl TE-Puffer für die zweite PCR verdünnt (1:20-Verdünnung).

Zweite PCR

5 µl 5x True Start Taq Buffer (10x)

3 µl 25 mM MgCl₂

1 µl 10 mM dNTPs (10 mM)

1 µl 1:20 Verdünnung der ersten PCR

2,5 µl Q_i-Primer (10 µM)

2,5 µl 3'-GSP2-Primer (10 µM)

0,5 µl TrueStart™ Taq-Polymerase (5 U/µl)

34,5 µl frisch autoklaviertes Wasser

| Temperatur (°C) | Zeit | Zyklen |
|-------------------|--------|--------|
| 95 | 5 min | 1 |
| 94 | 30 sec | 30 |
| 53 | 30 sec | |
| 72 | 3 min | |
| 94 | 30 sec | 1 |
| 53 | 30 sec | |
| 72 | 15 min | |
| Abkühlen auf 6 °C | | |

Es folgte die Analyse der PCR-Produkte mittels Agarosegel (siehe Kapitel 2.1.6) und die entsprechenden Banden wurden ausgeschnitten und aufgereinigt (siehe Kapitel 2.3.8.3). Nach der Ligation in den pDrive®-Vektor (siehe Kapitel 2.3.8.4), Transformation in EZ-Zellen (siehe Kapitel 2.3.8.5) Restriktionsverdau (siehe Kapitel 2.3.8.6), Anziehen von ÜN-Kulturen (siehe Kapitel 2.1.3), einer Plasmidpräparation (siehe Kapitel 2.1.4), Verdau (siehe Kapitel 2.3.8.6) und Kontrolle durch ein Agarosegel (siehe Kapitel 2.1.6) wurden die positiven Plasmide zur Sequenzanalyse zu Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany) geschickt.

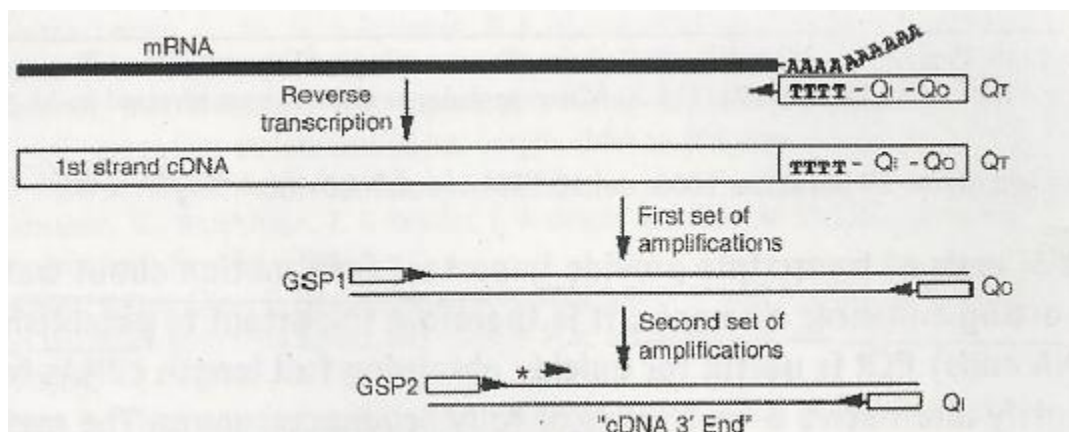


Abbildung 28: Schema der 3'-RACE aus Scotto-Lavino et al. 2006a

2.3.8.10 Amplifikation des 5'-Endes mittels RACE-PCR

Um das 5'-Ende zu generieren, wird die Reverse Transkription mithilfe eines genspezifischen Primers (GPRT = gene-specific primer for reverse transcription) durchgeführt (siehe Abbildung 29). Daran wird mittels Terminaler Desoxynukleotidyltransferase (Tdt) und dATP ein Poly-A-Schwanz gehängt. Die Amplifikation wird einerseits durch den Hybridprimer Q_T, welcher den zweiten Strang synthetisiert und außerdem durch den Q₀-Primer und einen GSP1-Primer erzielt. Zum Schluss wird mithilfe von „nested“-Primern (Q_i, GSP2) die Ausbeute spezifischer Produkte erhöht (Frohman und Martin 1989; Scotto-Lavino et al. 2006b).

Die cDNA wurde ebenso wie bei der 3'-RACE mittels des „Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit“ synthetisiert. Die 5'-RACE-PCR wurde leicht abgewandelt, wie von Scotto-Lavino et al. (2006b) beschrieben, durchgeführt.

cDNA-Synthese

- x µl RNA-Präparation (5 µg)
- x µl Wasser (Gesamtvolumen: 11,5 µl)

5 min im Wasserbad bei 70 °C erhitzen, sofort auf Eis stellen, kurz zentrifugieren und auf Eis lagern

Zugabe von:

- 4 µl 5x-Puffer
- 0,5 µl GPRT-Primer (100 ng/µl)
- 1 µl RNase-Inhibitor
- 2 µl 10 mM dNTPs

Inkubation für 5 min bei 25 °C, Zugabe von 1 µl Reverser Transkriptase, Inkubation für 60 min bei 42 °C und anschließend für 10 min bei 50 °C, Inaktivierung der Reversen Transkriptase für 15 min bei 70 °C, kurz zentrifugieren, auf Eis lagern

Abbau der RNA

- 0,75 µl (1,5 U) RNase H

Inkubation für 20 min bei 37 °C

Verdünnung und Aufreinigung der cDNA

- Zugabe von 180 µl TE-Puffer und 400 µl NucleoSpin®-NT-Puffer
- Aufreinigung mit NucleoSpin®-Extract II Kit (siehe Kapitel 2.3.8.3)

Anhängen des Poly-A-Schwanzes

Zugabe von:

- 4 µl 5x-Puffer (Tdt-Puffer)
- 0,5 µl dATP (2,5 mM)
- 0,5 µl Tdt (20 U/ µl)

Inkubation für 5 min bei 37 °C, Inaktivierung bei 70 °C für 10 min

Es werden eher Poly-A-Schwänze als Poly-C-Schwänze angehängt, da Poly-A-Bereiche innerhalb der Sequenz nur äußerst selten vorkommen. Somit ist die Wahrscheinlichkeit bedeutend geringer, dass unspezifische Bindungen oder verkürzte Amplifikationsprodukte entstehen (Scotto-Lavino et al. 2006b).

Verdünnung der cDNA

Zugabe von 30 µl TE-Puffer

Erste PCR

5 µl 5x True Start Taq Buffer (10x)
3 µl 25 mM MgCl₂
1 µl 10 mM dNTPs (10 mM)
1 µl 5'-cDNA (1:2,5-Verdünnung)
2,5 µl Q_T-Primer (10 µM)
2,5 µl Q_O-Primer (10 µM)
2,5 µl 5'-GSP1-Primer (10 µM)
0,5 µl TrueStart™ Taq-Polymerase (5 U/µl)
34,5 µl frisch autoklaviertes Wasser

| Temperatur (°C) | Zeit | Zyklen |
|-----------------|--------|--------|
| 95 | 5 min | 1 |
| 48 | 2 min | |
| 72 | 40 min | |
| 94 | 30 sec | 30 |
| 53 | 30 sec | |

| | | |
|-------------------|--------|---|
| 72 | 3 min | 1 |
| 94 | 30 sec | |
| 53 | 30 sec | |
| 72 | 15 min | |
| Abkühlen auf 6 °C | | |

Die Hybridisierungstemperatur ist geringer (48 °C) als bei der 3'-RACE (58 °C), da die cDNA-Synthese im ersten Zyklus auf der Interaktion des angehängten Poly-A-Schwanzes und dem Q_T-Primer beruht (Scotto-Lavino et al. 2006b).

Je 5 µl der Reaktionsansätze der ersten PCR wurden mit 95 µl TE-Puffer für die zweite PCR verdünnt (1:20-Verdünnung).

Zweite PCR

- 5 µl 5x True Start Taq Buffer (10x)
- 3 µl 25 mM MgCl₂
- 1 µl 10 mM dNTPs (10 mM)
- 1 µl 1:20 Verdünnung der ersten PCR
- 2,5 µl Q_T-Primer (10 µM)
- 2,5 µl 5'-GSP2-Primer (10 µM)
- 0,5 µl TrueStart™ Taq-Polymerase (5 U/µl)
- 34,5 µl frisch autoklaviertes Wasser

| Temperatur (°C) | Zeit | Zyklen |
|-----------------|--------|--------|
| 95 | 5 min | 1 |
| 94 | 30 sec | 30 |
| 53, 55, 57 | 30 sec | |
| 72 | 3 min | |
| 94 | 30 sec | |
| 53, 55, 57 | 30 sec | 1 |
| 72 | 15 min | |

Abkühlen auf 6 °C

Es folgte die Analyse der PCR-Produkte mittels Agarosegel (siehe Kapitel 2.1.6). Die entsprechenden Banden wurden ausgeschnitten und aufgereinigt (siehe Kapitel 2.3.8.3). Nach der Ligation in den pDrive®-Vektor (siehe Kapitel 2.3.8.4), Transformation in EZ-Zellen (siehe Kapitel 2.3.8.5) Restriktionsverdau mit *EcoRI* (siehe Kapitel 2.3.8.6), Anziehen von ÜN-Kulturen (siehe Kapitel 2.1.3), einer Plasmidpräparation (siehe Kapitel 2.1.4), Verdau (siehe Kapitel 2.3.8.6) und Kontrolle durch ein Agarosegel (siehe Kapitel 2.1.6) wurden die positiven Plasmide zur Sequenzanalyse Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany) geschickt.

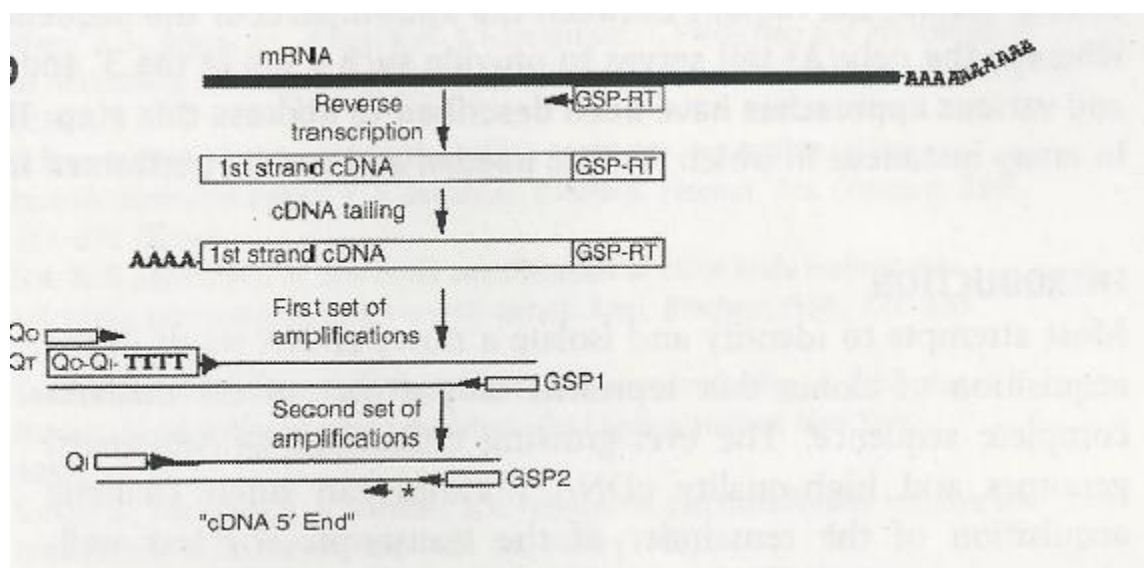


Abbildung 29: Schema der 5'-RACE aus Scotto-Lavino et al. 2006b

2.4 Charakterisierung einer Suspensionskultur von *Glechoma hederacea*

Zellkulturen sind in manchen Fällen in der Lage, größere Mengen an Naturstoffen zu akkumulieren als die Wildpflanzen (Rout et al. 2000; Verpoorte et al 2002; Karuppusamy 2009). In Suspensionskulturen von *Coleus blumei* wurde ein RA-Gehalt von bis zu 20% des Trockengewichts detektiert (Razzaque und Ellis 1977; Zenk et al. 1977; Ulbrich et al. 1985; Petersen und Alfermann 1988). In einer Suspensionskultur von *Salvia officinalis* konnten sogar 36% RA analysiert werden (Hippolyte et al. 1992).

2.4.1 Etablierung einer Kalluskultur

Das Blattmaterial von *Glechoma hederacea* wurde im Alten Botanischen Garten Marburg gesammelt und unter fließendem Wasser sorgfältig gewaschen. Anschließend wurde es

trocken getupft und für 1 min zum Vorsterilisieren in 96%igen Ethanol gelegt. Dann wurden die Blätter mit einer 10%igen chlorhaltigen Desinfektionslösung für 10-15 min desinfiziert. Die anhaftende Desinfektionslösung wurde dreimal mit sterilem Wasser abgespült. Nach dem Entfernen der ausgebleichenen Teile wurden Segmente von Blättern und Sprossen auf CB2-Agar gelegt (Petersen und Alfermann 1988). Kalluskulturen aus lockeren Zellen entwickelten sich bei 25 °C im Dunkeln. Diese wurden im Rhythmus von vier bis sechs Wochen auf ein neues CB2-Agarmedium (siehe Kapitel 7.3.4) umgesetzt.

2.4.2 Etablierung einer Suspensionskultur

Suspensionskulturen wurden angelegt, indem man 5 g Kalluszellen in 50 ml CB2-Medium (siehe Kapitel 7.3.4) in einem 250 ml EMK überführte und bei 110 UpM und 25 ± 1 °C im Dunkeln schüttelte. Die Suspensionskulturen wurden wöchentlich mithilfe eines hitzesterilisierten, perforierten Metallöffels in frisches Medium mit 2% Saccharose überimpft.

2.4.3 Steriles Animpfen der Kulturen

Am Tag 0 der Charakterisierungsperiode wurden in der Sterilbank von einer 7 Tage alten Suspensionskultur exakt 5 g Nassgewichtszellen mit dem hitzesterilisierten, perforierten Metallöffel in frisch autoklaviertes, flüssiges CB2-Medium überführt. Insgesamt wurden 72 Kolben angeimpft. Die Kolben, die am ersten Tag analysiert werden sollen, wurden als Letztes mit Zellen bestückt. Die restlichen Kolben wurden auf dem Rundschüttler bei 25 ± 1 °C im Dunkeln inkubiert. Pro Tag wurden ein bis drei Kolben als Proben genommen. Es wurden täglich drei voneinander unabhängige Ernten durchgeführt und die erhaltenen Werte gemittelt.

2.4.4 Bestimmen von Wachstumsparametern

Durch Abnutschen mit einem Büchnertrichter, in welchem sich ein Filterpapier befand, und einer Wasserstrahlpumpe konnten die Zellen vom Medium getrennt werden. Die Zellen wurden auf ein frisch tariertes Filterpapier überführt und gewogen (Frischgewicht). Von diesen Zellen wurden zweimal je 0,5 g in zuvor gewogene Plastikzentrifugenbecher gefüllt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Gefriertrocknen wurden sie noch einmal gewogen. Hieraus konnte das Trockengewicht der Zellen pro Kolben berechnet werden. Von den Doppelproben wurde jeweils der Mittelwert gebildet.

2.4.5 Herstellen des Proteinrohextrakts

Es wurden 5 g der feuchten Zellen in einen Plastikzentrifugenbecher eingewogen. Man gab 1 g Polyclar® 10 und 5 ml KP_i -Puffer pH 7,0 mit Zusatz von 1 mM DTT (Reduktionsmittel) hinzu. Polyclar® 10 ist ein hoch effektives Polyvinylpyrrolidon, es wird auch Crospovidon genannt. In der Lebensmittelindustrie wird es zur Stabilisierung bei der Bierherstellung eingesetzt und verhindert eine nicht-biologische Trübung. In der Biochemie wird es zum Binden von Polyphenolen angewendet.

Um den proteolytischen Abbau zu minimieren, erfolgte die gesamte Enzymaufarbeitung auf Eis. Mithilfe eines Schlagmesserhomogenisators wurden die Zellen für 3x 30 s homogenisiert. Dabei war auf eine fortwährende Kühlung durch Eis zu achten. Nach der Zentrifugation bei 10000 g, 4 °C für 20 min konnte der Rohextrakt vorsichtig dekantiert und auf Eis gestellt werden.

2.4.6 Bestimmen von Mediumsparemtern

Im zellfreien, beige-, später braunfarbenen Medium wurden folgende Parameter analysiert:

- pH-Wert: Messen mit vorkalibrierter pH-Elektrode
- Leitfähigkeit: ist ein Maß für die Menge gelöster Ionen, Medium wurde 1:4 mit Aqua dest. verdünnt und mit einer Leitfähigkeitselektrode fünfmal pro Ernte gemessen und der Mittelwert gebildet
- Zuckergehalt: wurde über Brechungsindex mit einem Refraktometer bestimmt

2.4.7 Bestimmen des Proteingehalts

Der Proteingehalt wurde aus dem Proteinrohextrakt (siehe Kapitel 2.1.12) bestimmt.

2.4.8 Enzymtest zur Bestimmung der Enzymaktivitäten

2.4.8.1 Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL)-Aktivität

Die Bestimmung der Enzymaktivität der PAL durch Bildung des Reaktionsprodukts *t*-Zimtsäure kann entweder photometrisch oder über HPLC erfolgen. Da die Methode über HPLC deutlich sensitiver ist, wurden zu 175 µl Borsäure-Borax-Puffer (0,078 M H₃BO₃, 0,03 M Na₂B₄O₇, 0,02 M NaCl) pH 8,8 und 50 µl 0,1 M Phenylalanin in Borsäure-Borax-Puffer, 25 µl des Proteinrohextrakts zugegeben. Nach einer Inkubationsperiode von 30 min bei 36 °C im Wasserbad wurde mit 20 µl 6 M HCl das Protein denaturiert. Die Reaktionsprodukte wurden durch Zugabe von Ethylacetat extrahiert. Dies erfolgte durch Zugabe von 500 µl Ethylacetat, gründlichem Mischen und Abzentrifugieren bei 16000 g für 5 min. Nach dem Abheben der oberen Phase wurde das Vorgehen noch zwei weitere Male wiederholt. Die Ethylacetatphasen wurden in einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß vereinigt und zur Trockene eingedampft. Die Rückstände wurden in 100 µl 50% MeOH/0,01% H₃PO₄ gelöst und bei 290 nm über HPLC detektiert.

2.4.8.2 Rosmarinsäuresynthase (RAS)-Aktivität

Die RAS-Aktivität wurde, wie in Kapitel 2.1.14 beschrieben, bestimmt.

2.4.9 Extraktion der Chlorogen-, Kaffee- und Rosmarinsäure

Zur Extraktion der Polyphenole wurden die bei -20 °C eingefrorenen Zellen der Trockengewichtsbestimmung benutzt. Die Extraktion wurde in derselben Weise, wie in Kapitel 2.3.7 beschrieben, durchgeführt.

2.4.10 Vergleich von Dunkel- und Lichtkulturen

Es existieren diverse Studien zur Akkumulation von CA als UV-Schutz bei verstärkter Lichtexposition, z.B. bei Suspensionskulturen von *Nicotiana plumbaginifolia* (Gillet et al. 1999) oder *Coffea arabica* (Baumann und Röhrig 1989).

Die Kaffeesäure-, CA- und RA-Gehalte einer *Glechoma*-Lichtkultur, welche 7-14 Tage (d) lang Dauerlicht ausgesetzt war, wurden untersucht (siehe Kapitel 2.3.7) und mit einer 7-14 d alten Dunkelkultur verglichen. Außerdem wurde RNA aus 7 d alten, gefriergetrockneten Dunkel- und Lichtkulturen isoliert (siehe Kapitel 2.3.1), in cDNA umgeschrieben (siehe Kapitel 2.3.3) und eine PCR durchgeführt, um die Expression von HST, der putativen HQT (siehe Kapitel 2.3.8.7), einer unbekannten HCT (Sander 2010) und einer RAS zu bestimmen. Es wurde eine semiquantitative PCR (siehe Kapitel 2.3.4.2) mit Zugabe von 1 µl cDNA durchgeführt.

2.5 Ozonbegasungsexperimente von *Melissa officinalis*

2.5.1 Ozonbehandlung von Melissen-Pflanzen

Die Messungen wurden an vier Monate alten Pflanzen, die in Potgrond H 70-Material (Klasmann-Deilmann GmbH, Geeste, Deutschland) gewachsen waren, durchgeführt. Sie wurden in der Wachstumskammer kontrollierten Bedingungen ausgesetzt. Es herrschten folgende Umgebungsbedingungen in der Wachstumskammer: Temperatur: 20±1 °C, relative Feuchtigkeit (relative humidity, RH): 85±5%, Photonenfluxdichte: 500 µmol Photonen m⁻² s⁻¹, welche durch Weißlichtlampen (SON-T 400W/220 E40 1SL, MASTER HPI-T Plus 400W/645 E40, Philips, Amsterdam) während einer Beleuchtungsdauer von 12 h pro Tag erzeugt wurden.

Die Pflanzen, welche die gleiche Größe aufwiesen, wurden in einer Plexiglaskammer, in der die gleichen Bedingungen wie in der Wachstumskammer herrschten, mit Ozon begast (Francini et al. 2008). Die Pflanzen wurden zwischen der zweiten und siebten Stunde der Tageslichtperiode für 5 h einer Ozonkonzentration von 80 ppb ausgesetzt. Die Blätter wurden 3, 5, 12 und 24 h nach Beginn der Ozonbegasung (from beginning of exposure, FBE) geerntet und bei -20 °C eingefroren.

Um einen Mehltaubefall zu verhindern, wurden die Pflanzen vor den Begasungsexperimenten mit Karathane® STAR (Dow AgroSciences, 40 ml hl⁻¹ Wasser)

gleichmäßig besprüht. Die Begasungsexperimente fanden im April 2012 im Gewächshaus des Departments für Agrikultur, Ernährung und Umwelt der Universität in Pisa statt.

2.5.2 Untersuchungen zu Membranschäden

2.5.2.1 TBARS (thiobarbituric acid reactive substances)-Test

Das Ausmaß der Lipidperoxidation wurde durch den TBARS-(thiobarbituric acid reactive substances) Test nach einer Methode von Hodges et al. (1999) bestimmt. Das sekundäre Lipidoxidationsprodukt Malondialdehyd (MDA) wird durch Autooxidation und enzymatischen Abbau von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in Membranen gebildet (siehe Abbildung 30). Es reagiert mit zwei Molekülen der Thiobarbitursäure (TBA, thiobarbituric acid) über eine säurekatalysierte, nukleophile Reaktion. Als Reaktionsprodukt bildet sich ein rotes Chromophor mit einer Absorption bei 532 nm.

0,5 g Blätter wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert, in 2,25 ml 0,1%iger Trichloressigsäure (TCA, trichloroacetic acid) suspendiert und bei 8000 g für 20 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde mithilfe eines sterilen 0.2 µm Minisart® SRT 15 Filters filtriert. 1 ml wurden zu 4 ml 20%iger TCA und 0,025 ml 0,5%iger TBA gegeben. Die Mischung wurde für 30 min bei 95 °C erhitzt, danach sofort in Eis gekühlt und unter den gleichen Bedingungen (s.o.) zentrifugiert. Die Absorption des Überstands bei 532 nm wurde durch Subtrahieren der Absorption bei 600 nm korrigiert, welche unspezifische Trübungen repräsentiert. Als Blindwert wurde ein Aliquot des Extrakts ohne TBA inkubiert, da MDA-Zucker-Komplexe, die ebenso bei 532 nm absorbieren, die Messung verfälschen könnten. Die Menge an MDA wurde mit einem Extinktionskoeffizienten von $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ berechnet.

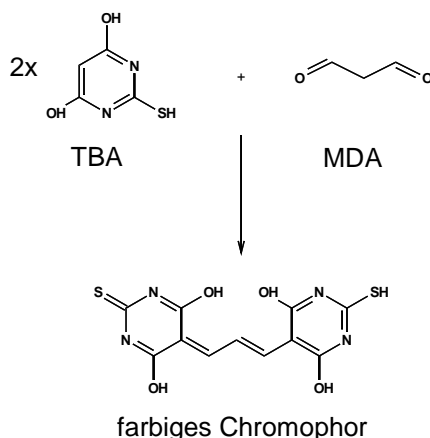


Abbildung 30: TBARS (thiobarbituric acid reactive substances)-Test

2.5.3 Untersuchungen der Photosynthesepigmente

Die Bestimmung der Photosynthesepigmente erfolgte durch die HPLC-Methode nach Ciompi et al. (1997). 30 mg Blätter, welche zuvor für die Chlorophyll a Fluoreszenz- und für die Gasaustauschmessungen verwendet wurden, wurden in 3 ml MeOH gegeben und über Nacht bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Der grünlich gefärbte Überstand wurde durch einen 0.2 µm Minisart® SRT 15 Sterilfilter filtriert und sofort mittels HPLC analysiert. Die HPLC-Analyse fand bei Raumtemperatur mit einer „reversed phase“ Dionex Säule (Acclaim 120, C 18, 5 µm Partikelgröße, 4,6 mm innerer Durchmesser × 150 mm Länge) statt. Die Pigmente wurden mit 1 ml/min Flussrate mit einem Elutionsgradienten eluiert. Um alle Xanthophylle zu bestimmen, wurde 100% Fließmittel A (Acetonitril/MeOH, 75/25, v/v) benutzt. Damit erreichte man auch eine Trennung des Luteins von Zeaxanthin. Dem folgte ein dreiminütiger linearer Gradient zu Fließmittel B (MeOH/Ethylacetat, 68/32, v/v). Durch 15-minütige Elution mit Fließmittel B erfolgte die Elution von Chlorophyll b, a und β-Carotin. Die Pigmente wurden bei einer Wellenlänge von 445 nm detektiert. Die Säule wurde für 10 min mit 100% Fließmittel A reäquilibriert, bevor die nächste Injektion vorgenommen wurde. Folgende Standards wurden zur Quantifizierung des Pigmentgehalts benutzt: Chlorophyll a und b, Zeaxanthin, β-Carotin, Lutein (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

2.5.4 Histochemische und cytochemische Untersuchungen

2.5.4.1 H₂O₂-Akkumulation

2.5.4.1.1 Methode nach Thordal-Christensen

Um die optimale Färbemethode zum Nachweis von H₂O₂ zu finden, wurden verschiedene Methoden getestet: Zu Beginn wurde die Methode nach Thordal-Christensen et al. (1997) angewandt. Dazu wurden 1 mg/ml 3,3'-Diaminobenzindin (DAB)-Lösung mit konzentrierter HCl auf einen pH von 3,8 eingestellt. Es wurden drei Stücke von drei Blättern genommen und für acht Stunden in dieser Lösung in einer Petrischale im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Blattstücke für 10 min in kochendem 96%igem Ethanol vom Chlorophyll befreit und mikroskopiert. Das Vorhandensein von H₂O₂ kann man an einer rot-braunen Präzipitation in der Mitte des Blattstückes erkennen. In den Marginalbereichen des Blattes finden sich gewöhnlich durch die Zerstörung der Blattstruktur starke Präzipitationen, die aber nicht beachtet wurden.

2.5.4.1.2 Methode nach Iriti

Dann wurde die Methode nach Iriti et al. (2003) eruiert. Dazu wurden die Blätter 1 cm oberhalb des Petiolus abgeschnitten und der Blattstiel mit der verbliebenen Blattspreite in ein Becherglas gesetzt, in dem sich 1 mg/ml DAB-Lösung befand, die vorher mit 5 N NaOH auf einen pH von 5,6 eingestellt worden war. 5 mm des basalen Teils des Blattes sowie der Blattstiel tauchten in die Lösung, welche nun für 8 h im Dunkeln in einer temperierten Plexigaskammer (siehe Kapitel 2.5.1) inkubieren mussten. Zum Entfärben wurden die Blattstiele,

an denen noch die basalen Blattfragmente hingen, für 10 min in kochenden Ethanol gelegt und anschließend unter dem Mikroskop analysiert.

2.5.4.1.3 Methode nach Šnyrychová

Zuletzt wurde die Methode nach Šnyrychová et al. (2009) durchgeführt. Im Protokoll wurden verschiedene DAB-Konzentrationen (0,1; 0,5 und 1 mg/ml) verwendet und eine DAB-Konzentration von 0,1 mg/ml empfohlen. Da jedoch dort 3-4 Wochen alte Blätter von *Nicotiana tabacum* verwendet wurden, welche erfahrungsgemäß extrem dünn sind, wurde bei diesem Experiment wieder eine Konzentration von 1 mg/ml gewählt. Die Lösung wurde wieder mit HCl angesäuert und danach mit 5 N NaOH auf einen pH zwischen 6 und 7 gebracht. Nach Zugabe der entsprechenden Menge NaOH schlug die Farbe von rosa nach orange/gelblich um. Laut Protokoll sollte ein ganzes Blatt in eine Petrischale gelegt und von der Lösung für acht Stunden infiltriert werden. Anschließend sollte das Blatt in zwei Hälften geschnitten werden. Die eine Hälfte sollte im Dunkeln belassen, die andere Hälfte sollte mit $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ für 30 min bestrahlt werden. Da die photosynthetisch aktive Strahlung (photosynthetically active radiation, PAR)-Lampe zu dieser Zeit nicht funktionierte, wurde mit dem dunkeladaptierten Blatt weiter gearbeitet.

2.5.4.1.4 Optimierte Methode nach Iriti

Man stellte zuerst eine DAB-Lösung her, indem 0,01 g DAB unter Rühren in 6 ml Aqua dest. bei geringer Hitze aufgelöst wurden. Damit sich die Substanz lösen kann, ist ein saurer pH vonnöten. Deshalb wurden 12 μl konzentrierte HCl dazugegeben, um einen pH von ca. 2 zu erhalten. Mit 16 μl 5 N NaOH stellte man danach einen pH von 5,6 her. Diese Lösung wurde in einer Petrischale zu drei in Stücke geschnittenen Blättern gegeben, wobei die Mittelneratur vermieden werden musste. Diese Lösung mit den Blattfragmenten ließ man für 8 h im Dunkeln inkubieren, damit die DAB-Lösung gut vom Gewebe aufgenommen werden konnte. Danach wurde das Chlorophyll in den Blattfragmenten durch Kochen in 96%igem Ethanol entfernt.

2.5.4.2 Evansblau-Färbung

Mittels der Evansblau-Färbung kann der Zelltod detektiert werden (Iriti et al. 2003). Dazu wurden Blattstücke in einer Mischung (1:1:1:1) aus Phenol, Milchsäure, Glycerol und Aqua dest., welche 20 mg/ml Evans Blue enthielt, für 1 min gekocht. Die Lösung wurde mit einer Pipette abgenommen, und auf die Blattstücke wurde eine verdünnte Chloralhydratlösung (2,5 mg/ml) gegeben. Die Lösung wurde mit einer Pipette abgesaugt und die Prozedur noch drei weitere Male wiederholt. Als Nächstes gab man eine konzentrierte Chloralhydratlösung (2,5 g/ml) auf die Blattstücke, welche die Zellstruktur zerstörte. Abgestorbene Zellen erschienen unter dem Mikroskop blau.

2.5.5 Ökophysiologische Untersuchungen

2.5.5.1 Gasaustauschparameter

Der CO_2 - und der Wasserdampfaustausch des Blattes wurden mittels eines tragbaren Infrarotgasanalysators (**CIRAS-2** = **C**ombined **I**nfrared **G**as **A**nalysis **S**ystem, PP-Systems, Stotfold, UK), welches mit einer Parkinson-Blattkammer ausgestattet ist (siehe Abbildung 31), bei Raumtemperatur bestimmt. Mit diesem Gerät können einzelne Blätter spezifisch untersucht werden. Die Analysen wurden bei einer konstanten Außen- CO_2 -Konzentration (CO_2 -Kapsel) von 340-360 ppm und bei einer RH von 80% durchgeführt. Die Kammer wurde mit einer Quarzhalogenlampe belichtet, und die Blatttemperatur betrug exakt $26 \pm 0,4$ °C. Die Ozonkonzentration im Blatt wurde vor der Begasung als nicht existent angenommen (Laisk et al. 1989). Die stomatäre Leitfähigkeit für Wasserdampf (G_w) wurde direkt mit der CIRAS-Apparatur gemessen. Die Leitfähigkeit des Blattes für Ozon, welches hauptsächlich über die Stomata aufgenommen wird, wurde von dem Infrarotgasanalysator berechnet, indem G_w mit 0,612, dem Wert für die relative Diffusion für Wasserdampf und Ozon, multipliziert wurde (Polle et al. 1995). Die Photosyntheseaktivität bei Lichtsättigung [saturating light level (A_{sat})] wurde bei $1200 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bestimmt. Die Berechnung der interzellulären CO_2 -Konzentration (C_i) basierte auf den Gleichungen, welche durch von Caemmerer und Farquhar (1981) beschrieben wurden. Die unverzögerte Transpirationseffizienz (ITE, instantaneous transpiration efficiency) kann durch den Quotienten zwischen A_{sat} und der Evapotranspirationsrate (E), die durch den Infrarotgasanalysator gemessen wird, bestimmt werden. Die ITE ist definiert als das Verhältnis zwischen der CO_2 -Aufnahme pro Einheit und Wasser, das durch die Transpiration verloren geht (Barton 2011). Die Messungen wurden an drei verschiedenen Pflanzen durchgeführt. Die photosynthetischen CO_2 -Assimilationsantworten bezüglich der Strahlungsdichte wurden über die Gleichung nach Smith (Tenhunen et al. 1976) ermittelt, wobei eine spezifische CO_2 -Konzentration von 350 ppm festgelegt wurde. Mithilfe der Steigung der Lichtantwortkurve („light response curve“), welche sich durch die Blatt- CO_2 -Aufnahme (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bei einer bestimmten photosynthetischen Photonenstromdichte (PPFD, photosynthetic photon flux density, $\mu\text{mol mol}^{-2} \text{s}^{-1}$) bestimmen lässt, konnte die apparente Quantenausbeute (Φ_a = apparent quantum yield) berechnet werden. Diese wurde durch die Anfangssteigung d_A/d_{PPFD} der Kurve über lineare Regression berechnet, wobei Werte bei einer PPFD $< 300 \mu\text{mol mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ benutzt wurden. Die apparente Quantenausbeute repräsentiert die Effizienz, mit der Lichtquanten in der Pflanze umgesetzt werden. Die Berechnung derselben basiert auf dem einfallendem und nicht dem absorbiertem Licht (Long et al. 1996).

Die Beziehung der Blatt- CO_2 -Aufnahme (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$) zu der interzellulären CO_2 -Konzentration ($C_i < 200 \mu\text{mol mol}^{-1}$) wurde unter Zuhilfenahme des mechanistischen Modells der CO_2 -Assimilation von Sharkey (1985) bestimmt (A/C_i -Kurve). Mithilfe der Steigung aus d_A/d_{C_i} konnte die Quanteneffizienz (Φ_{CO_2} = quantum efficiency) berechnet werden (Long und Bernacchi 2003).

V_{cmax} (maximale Carboxylierungsrate der RuBisCO), J_{max} (maximale Elektronentransportrate zur Regeneration von Ribulose 1,5-bisphosphat = RuBP), R_d (Tagesrespirationsrate) und TPU (Triosephosphatverwertung = triose phosphate utilization) wurden nach Dubois et al. (2007) bestimmt (Long und Bernacchi 2003). In der Assimilationskammer herrschte eine RH von $63 \pm 7\%$ und eine Temperatur von $25 \pm 1,1^\circ\text{C}$.



Abbildung 31: Infrarotgasaustauschsystem (CIRAS)

2.5.5.2 Chlorophyll a Fluoreszenzparameter

Um eine Aussage über die Fluoreszenzmenge treffen zu können, ist es wichtig, zwischen dem photochemischen und dem nicht-photochemischen „Quenching“ zu unterscheiden (siehe Kapitel 1.6.2, Abbildung 10). Es wird angestrebt, vor allem den Anteil der Photosynthese (photochemisches Quenching) zu unterdrücken, um den Anteil der Fluoreszenz und der Wärmeabgabe (nicht-photochemisches Quenching) bestimmen zu können. Das Ausschalten der Photosynthese wird *in vitro* durch das Herbizid Diuron [DCMU, 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-Dimethylharnstoff], welches PSII vollständig inhibiert, erreicht. Diese Methode ist aufgrund des langsamen und uneinheitlichen Penetrierens von DCMU nicht praktikabel. Deshalb wird die sättigende Lichtblitzmethode angewandt, um die Photosynthese komplett auszuschalten (Maxwell und Johnson 2000).

Chlorophyll a-Messungen und Messungen des Elektronentransports des PS II wurden mit einem tragbaren Fluorometer (**PAM-2000** = **P**uls-**A**mplituden-**M**odulation, Walz, Germany) bei Raumtemperatur durchgeführt. Die zu messenden Bereiche der Blätter mussten jedoch vor den Messungen mit einem speziellen Clip für 20 min in einen dunkeladaptierten Zustand gebracht werden. Früher betrug die Zeit des Adaptierens 40 min, doch empirische Messungen der Arbeitsgruppe Nali konnten zeigen, dass 20 min ausreichen, damit alle PS II-Zentren vollständig offen sind, d.h. sich in ihrem Ausgangszustand befinden. Es wurden die gleichen Blätter des dritten Blattpaares von unten wie bei den CIRAS-Messungen gewählt. Die minimale Fluoreszenz F_0 , bei der alle primären Chinonakzeptoren (Q_A) oxidiert und zur Photoreduktion befähigt sind, also alle PS II-Zentren offen sind, wurde folgendermaßen bestimmt (siehe Abbildung 32): Der Messstrahl (MB: measuring beam) war so gering ($< 1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), dass keinerlei signifikante, variable Fluoreszenz ausgelöst wurde. Das maximale Fluoreszenzlevel F_m^0 (alle PS II-Zentren sind geschlossen, Q_A ist vollständig reduziert, keine Photosynthese möglich) wurde durch einen sättigenden Lichtblitz (SP = saturating light

pulse) für 0,8 Sekunden bei $8000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ im dunkeladaptierten Zustand bestimmt. Die variable Fluoreszenz ist die Differenz zwischen maximaler Fluoreszenz F_m^0 und minimaler Fluoreszenz F_0 im dunkeladaptierten Zustand. Die Fluoreszenzinduktion begann mit aktinischem Licht ($\sim 400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und wurde mit 800 ms dauernden, sättigenden Lichtblitzen ($10000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PFD = photon flux density, Photonenstromdichte) überlagert. Diese Pulswellen entstanden in 20-Sekunden-Intervallen, um die maximale Fluoreszenz im lichtadaptierten Zustand, bei dem alle PS II Zentren geschlossen sind, zu bestimmen (F'_m). Die minimale Fluoreszenz im lichtadaptierten Zustand (F'_0) wurde sofort bestimmt, nachdem das aktinische Licht in der Gegenwart des dunkelroten Hintergrundlichts ($>710 \text{ nm}$) für 10 Sekunden ausgeschaltet war, um eine maximale Oxidation der PS II-Elektronenakzeptoren zu gewährleisten (alle PSII-Zentren sind offen). Die sättigende Lichtblitzmethode (Maxwell und Johnson 2000; Baker 2008) wurde auch zur Berechnung des photochemischen Quenchings und des nicht-photochemischen Quenchings (siehe Kapitel 1.6.2) benutzt (Schreiber et al. 1986). Die tatsächliche Quantenausbeute (Φ_{PSII} , „actual quantum yield“) wurde folgendermaßen berechnet: $(F'_m - F_t) / F'_m$, wobei F_t die steady-state Menge der Fluoreszenz im lichtadaptierten Zustand ist, wie es von Rohacek (2002) beschrieben wurde.

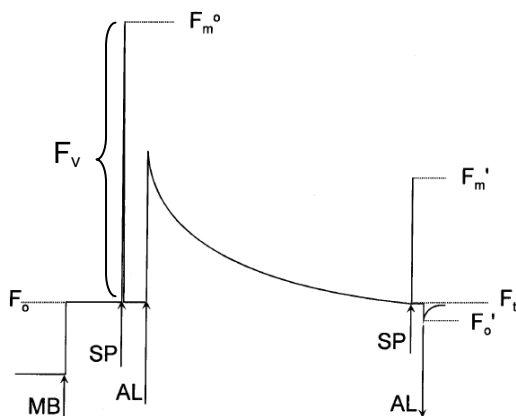


Abbildung 32: Sättigende Lichtblitzmethode; F_0 : minimale Fluoreszenz im dunkeladaptierten Zustand, F_m^0 : maximale Fluoreszenz im dunkeladaptierten Zustand, F_v : variable Fluoreszenz im dunkeladaptierten Zustand, MP: Messstrahl (measuring beam), SP: sättigender Lichtblitz (saturating light pulse), AL: aktinisches Licht (actinic light), F'_m : maximale Fluoreszenz im lichtadaptierten Zustand, F'_0 : minimale Fluoreszenz im lichtadaptierten Zustand, F_t = steady-state Menge der Fluoreszenz im lichtadaptierten Zustand, geänderte Abbildung aus Maxwell und Johnson (2000)

2.5.6 Messung des Abscisinsäuregehalts über ELISA

Das monocyclische Sesquiterpen Abscisinsäure (ABA) spielt eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Seneszenz und der Stomataöffnung (Tintelnot 2006). 1949 entdeckte Paul F. Wareing, dass ruhende Knospen der Esche oder von Kartoffeln große Mengen eines bestimmten Wachstumshemmstoffs enthielten, welchen er auf den Namen Dormin taufte. 1968 berichtete Frederic T. Addicott über eine in Blättern und Früchten vorkommende Substanz,

welche den Abwurf (Abscission) beschleunigte. Bald erkannte man, dass das von ihm benannte Abscisin und Dormin identische Molekülstrukturen aufwiesen. Im heutigen Sprachgebrauch wird sie als ABA bezeichnet. ABA koordiniert die Antworten der Pflanze auf bestimmte Stressoren, wie Trockenheit, extreme Temperaturen und hohe Salzkonzentrationen, aber reguliert auch nicht-stressbedingte Reaktionen, wie die Samenkeimung und den Ruhezustand der Knospe (Sheard und Zheng 2011). Die am besten untersuchte Funktion der ABA ist die Regulierung des Stomatatschlusses bei Wasserstress. Außerdem kann sie als Gegenspieler anderer Hormone, wie Auxine, Gibberelline und Cytokinine in Bezug auf das Wachstum betrachtet werden. Ebenso wurde bei dem Pflanzenhormon ABA gezeigt, dass es die Zellteilung und/oder die DNA-Synthese in verschiedenen Pflanzen hemmt (Steward und Smith 1972; Newton 1977).

Im Gegensatz zu einem Sandwich-ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay), bei dem die Platte mit einem speziellen Antikörper beladen wird, wird bei dem indirekten ELISA die Mikrotiterplatte mit einer Lösung versetzt, die das Antigen enthält (siehe Abbildung 33). Alle nicht-bindenden Stellen müssen blockiert werden, um falsch positive Reaktionen zu verhindern. Der detektierende Antikörper wird hinzugefügt und bindet an das Antigen. Der mit einem Enzym (alkalische Phosphatase) verbundene zweite Antikörper wird zugefügt und bindet an den detektierten Antikörper. Die durch das Reporterenzym katalysierte Reaktion dient als Nachweis für das Antigen. Das Substrat kommt zuletzt hinzu und wird durch das Enzym in eine detektierbare Substanz umgewandelt (Vernieri et al. 1989; Berg et al. 2002).

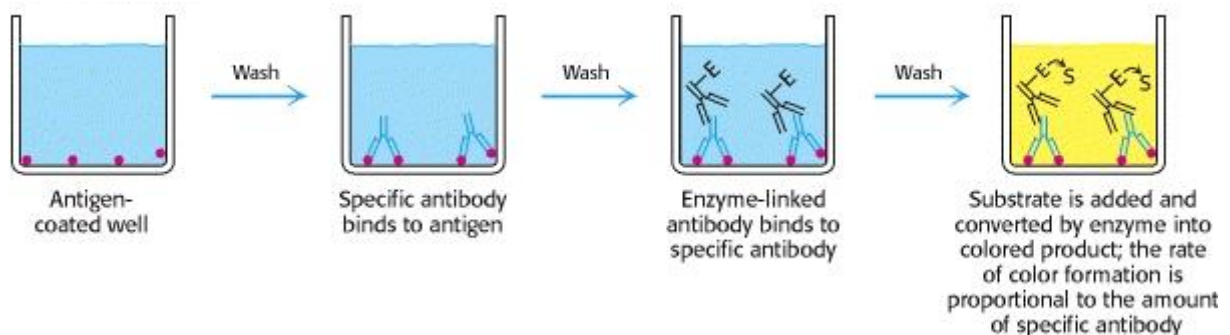


Abbildung 33: indirekter ELISA, geänderte Abbildung aus Berg et al. 2002

Der monoklonale Antikörper DBPA-1 = decorin-binding protein A gegen ABA wurde von Prof. Vernieri entwickelt (Vernieri et al. 1989; Perata et al. 1990). Die Analysen wurden von Dr. Alice Trivellini nach dem Protokoll von Ferrante et al. (2012) an der Universität von Pisa im April 2012 durchgeführt.

2.5.7 Bestimmung des Rosmarinsäuregehalts

Der RA-Gehalt wurde, wie in Kapitel 2.3.7 beschrieben, über eine Extraktion mit 70%igem Ethanol bestimmt. Die Proteinextraktion erfolgte mit 0,1 M KP_i -Puffer pH 7,0 (siehe Kapitel 2.4.5), und die Konzentration wurde über den Bradford-Test bestimmt (siehe Kapitel 2.1.12).

2.5.8 Bestimmung der PAL- und RAS-Aktivität

Die Bestimmung der Aktivität von PAL und RAS erfolgte, wie in Kapitel 2.4.8.1 und 2.1.14 beschrieben, durch die HPLC-Analyse.

2.5.9 Statistik

Für jeden Versuch wurden drei unterschiedliche Pflanzen, die jedoch Klone von derselben Mutterpflanze waren, verwendet. Für die statistischen Untersuchungen wurde ein ein-faktorieller ANOVA angewandt. Um Vergleiche zwischen Mittelwerten zu bestimmen, wurde der Fisher's LSD „multiple comparison test“ mit $P \leq 0.05$ benutzt. Alle Analysen wurden mit der NCSS 2000 Statistical Analysis System Software ausgeführt.

2.5.10 Expressionsanalyse durch semiquantitative PCR

Um den Einfluss von Ozon auf die Genexpression in *M. officinalis* zu bestimmen, wurden Expressionsanalysen mithilfe der semiquantitativen PCR-Technik durchgeführt. Um RNA aus den gefrorenen Blättern (-80 °C) zu isolieren, wurde die Methode nach Chomczynski und Sacchi (1987) verwendet (siehe Kapitel 2.3.1). Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt, und die Qualität wurde über ein 0,7%iges Agarosegel (siehe Kapitel 2.1.6) verifiziert. Die cDNA-Synthese erfolgte mithilfe des RevertAid® First Strand cDNA Synthesis Kits (siehe Kapitel 2.3.3), wobei 0,5 µg RNA eingesetzt wurden. Mithilfe der semi-quantitativen PCR (25 Zyklen) konnten Vollängen(VL)-Sequenzen von PAL (2130 bp), 4CL (1623 bp), TAT (1236 bp) und RAS (1284 bp) mit spezifischen Primern amplifiziert werden (siehe Kapitel 2.3.4.2). Der eukaryotische Elongationsfaktor EF1α (540 bp) und β-Aktin (313 bp) dienten als interne Standards. Die Primer wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany) synthetisiert. Die PCR wurde in Standardansätzen (siehe Kapitel 2.3.4.2) mit 1 µl cDNA (für EF1α 1:10 verdünnt) durchgeführt. Um die PCR-Produkte zu visualisieren, wurde eine Elektrophorese mit einem 0,7%igen Agarosegel (siehe 2.1.6) durchgeführt. Anschließend wurde das Gel in einem Ethidiumbromidbad, welches aus 0,005% Ethidiumbromid in 0,5 M Tris/Borsäure/EDTA (TBE) Puffer bestand, für 30 min unter Schaukeln gefärbt. Die Entfärbung fand in 0,5 M TBE Puffer für ebenfalls 30 min statt.

| Temperatur (°C) | Zeit | Zyklen |
|---|---------|--------|
| 94 | 2 min | 1 |
| 94 | 30 sec | 25 |
| β-Aktin (54); EF1α (62); 4CL (54); PAL (58); RAS (54); TAT (54) | 1 min | |
| 70 | 150 sec | |
| 72 | 10 min | 1 |
| Abkühlen auf 6 °C | | |

| Primername | Sequenz | Schmelztemperatur (°C) |
|------------|---|------------------------|
| β-Aktin f | 5'-GGATGATATGGAGAAGAT(T/A)TGTGGC-3' | 58,0 |
| β-Aktin r | 5'-AGATCACGMCCAGC(A/T)AGATC-3' | 59,4 |
| EF1α f | 5'-GACAAGCCCCTCCGTCTCCAC-3' | 67,7 |
| EF1α r | 5'-GCATCACCRTTCTTCAAGAACTTRGG-3' | 63,2 |
| PAL MoVL 5 | 5'-ATACATATGGCAGAGAACGGTCATCATGATTCC-3' | 65,0 |
| PAL MoVL 3 | 5'-ATACATATGCTAGCAGATAGGCAGAGGTGCACCATTC-3' | 69,0 |
| 4CL-f | 5'-ATGGAGAACCCGGCAGGCCAAG-3' | 66,0 |
| 4CL-r | 5'-TTAGACTGCAGCTGCTAATCTTGATCTC-3' | 62,0 |
| MoTAT-VLf | 5'-attaCATATGGAGTTGCAGAATTCAGCG-3' | 57,9 |
| MoTAT-VLh | 5'-tatCTCGAGCTATTAGTAGGTGTGCCGTTTCGC-3' | 59,4 |
| RAS-VL 5n | 5'-TTGGATCCATGAGGATCGATATCAAGGACTC-3' | 59,0 |
| RAS-VL 3rc | 5'-TAGGATCCTCATCAAATCTCATAAAACAACCTTCTC-3' | 54,0 |

2.5.11 Expressionsanalyse durch quantitative Real-Time-PCR

Um genauere Aussagen über die Transkriptionslevel der vier untersuchten Gene (PAL, 4CL, TAT und RAS) machen zu können, wurde eine quantitative Echtzeit-PCR durchgeführt. Der Vorteil liegt in der Bestimmbarkeit der Menge des amplifizierten PCR-Produkts nach jedem Zyklus. Außerdem ermöglicht diese Methode deutlich besser, quantitative Unterschiede zu bestimmen als die semiquantitative PCR. Weitere Unterschiede sind die Ermittlung von Standardkurven und deutlich kürzere Amplifikationsprodukte.

Das Prinzip der verwendeten Farbstoff-Inkorporationsmethode wird nachfolgend beschrieben: Während der anfänglichen Denaturierung gibt der freie SYBR[®] Green Farbstoff nur sehr geringe Fluoreszenzintensitäten ab. Diese Menge an Hintergrundfluoreszenz ist als Basislinie erkennbar. Während der Annealingphase binden wenige Farbstoffmoleküle an die doppelsträngige DNA, welche aus der template-DNA und den Primern besteht. Diese wenigen, interkalierenden Farbstoffmoleküle bewirken eine Lichtemission. In der darauf folgenden Polymerisationsphase interkalieren mehr und mehr Farbstoffmoleküle in die neu synthetisierte Doppelstrang-DNA, und der Anstieg an Fluoreszenz kann pro Zyklus in Echtzeit gemessen werden. Der Anstieg des Fluoreszenzsignals ist direkt proportional zu den Produktmolekülen, welche in der PCR-Reaktion generiert werden. Während der Denaturierungsphase „schmilzt“ die DNA, das heißt sie wird wieder einzelsträngig, die Farbstoffmoleküle lösen sich von der DNA, und das Fluoreszenzsignal kehrt wieder zum Hintergrundlevel zurück. Das Maximum der „melting curve“ ist identisch mit dem Schmelzpunkt der neu synthetisierten DNA (Invitrogen, Real-time PCR Handbuch).

Für die quantitative Real-Time-PCR der PAL-, 4CL-, TAT- und RAS-Gene wurden spezifische Primer mit einer Amplikonlänge von ca. 130 bp genutzt. Der Entwurf der Primer erfolgte mithilfe eines Programms von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany). Um

RNA aus den gefrorenen Blättern (-80 °C) zu isolieren, wurde erneut die Methode nach Chomczynski und Sacchi (1987) benutzt (siehe Kapitel 2.3.1). Die Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt, und die Qualität wurde über ein 0,7%iges Agarosegel verifiziert (siehe Kapitel 2.1.6). Die cDNA Synthese erfolgte mithilfe des RevertAid® First Strand cDNA Synthesis Kit (siehe Kapitel 2.3.3), wobei 0,5 µg RNA eingesetzt und die lyophilisierte cDNA in 15 µl nuklease-freiem Wasser verdünnt wurde. Die cDNA wurde zweimal 1:4 verdünnt.

Reaktionsansatz:

2 µl cDNA (entspricht 4,16 ng der ursprünglichen RNA)
0,45 µl Primer f (10 µM)
0,45 µl Primer r (10 µM)
4,6 µl nukleasefreies Wasser
7,5 µl 2x iQ™ SYBR® Green Supermix

Der 2x iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) enthält den SYBR® Green I Farbstoff; 50 U/ml iTaq™ DNA-Polymerase; dNTPs (jeweils 0,4 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP); 6 mM MgCl₂; 40 mM Tris-HCl pH 8,4; 100 mM KCl; 20 nM Fluorescein und Stabilisatoren.

Die quantitative Real-Time-PCR Analyse wurde in einem Rotor-Gene® Q RT-PCR System (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Das Profil umfasst drei Segmente:

- (1) 95 °C für 3 min,
- (2) 40 Zyklen bei 95 °C/15 s, 56 °C/30 s, 72 °C/30 s und
- (3) eine Dissoziationskurve von 55-95 °C mit 0.5 °C/5 s Zuwachsintervallen

Als endogene Kontrollen fungierten EF1α und β-Aktin, über welche die Expression der Zielgene standardisiert wurde. Für jede biologische Probe wurden drei technische Replikationen durchgeführt. Außerdem wurden Standardkurven mit 5 Punkten von verschiedenen Konzentrationen der vereinigten cDNA (entsprechen 16,66; 4,16; 1,04; 0,26; 0,06 ng der ursprünglichen RNA, jeder Ansatz enthielt 2 µl cDNA) aufgenommen, um die Effizienz jedes Primers zu verifizieren. Um Primerdimere und unspezifische Produkte auszuschließen sowie die Spezifität der quantitativen Real-Time-PCR zu bestätigen, wurden Schmelzkurvenanalysen und eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Das Gel wurde hergestellt, indem 0,8 g Agarose in 100 ml 1x TBE-Puffer unter Erwärmen gelöst wurden. In die flüssige Agarose wurden 10 µl SYBR® Green I Farbstoff (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) gegeben, und das Gel wurde in den Gelträger gegossen. Nach dem Einsetzen des Kamms und dem Auspolymerisieren der Agarose wurden 12 µl Probe mit 4 µl Loading Dye vermischt und in die Taschen pipettiert. Bei 120 V ließ man das Gel 1 h laufen und analysierte anschließend das Gel auf einem UV-Transilluminator.

Das Expressionslevel der vier Zielgene wurde jeweils auf das Transkriptionslevel der beiden „housekeeping“ Gene EF1α und β-Aktin normalisiert und mithilfe der REST 2009 Software

(Corbett Research Pty. Ltd. und Pfaffl, 2009; Setiawan und Lokman 2010) berechnet. Der „cycle threshold“, die Effizienz und der Korrelationskoeffizient wurden automatisch von der Rotor-Gene® Q Series Software bestimmt.

| Primername | Sequenz (bp) | Schmelztemperatur (°C) |
|------------------|-------------------------------|------------------------|
| PAL-f | 5'-GCCGAAGTCATGAACGGAAAGC-3' | 56,9 |
| PAL-r | 5'-CGCAGCCTTAACATAACCGCTC-3' | 56,5 |
| 4CL-f | 5'-AGACGATCATGCTCTTGCTCCC-3' | 56,5 |
| 4CL-r | 5'-GGCCTTGGCTTGCTTGATTACC-3' | 56,5 |
| TAT-f | 5'-CCTACAAGCTACCAGCCGACTC-3' | 56,6 |
| TAT-r | 5'-AGCCCGTAGATTGGGAAACACG-3' | 57,0 |
| RAS-f | 5'-ACGCCCGACCTCAACCTTATC-3' | 58,4 |
| RAS-r | 5'-AAGTGGTGCTCGTTTGCCACG-3' | 58,5 |
| EF1 α -f | 5'-TTGCTGCTGCAACAAGATGGAC-3' | 56,4 |
| EF1 α -r | 5'-GGGACGAATGCGATTTTGTCTGG-3' | 57,0 |
| β -Aktin f | 5'-TGTATGTTGCCATCCAGGCCG-3' | 57,2 |
| β -Aktin r | 5'-AGCATGGGGAAGCGCATAACC-3' | 57,5 |

2.5.12 Antioxidative Mechanismen in *Melissa officinalis*

Die Messungen wurden an vier Monate alten Pflanzen durchgeführt. Sie wurden in der Wachstumskammer kontrollierten Bedingungen (siehe Kapitel 2.5.1) ausgesetzt. Die Pflanzen wurden, wie bei dem Experiment im vorherigen Jahr, für 5 h mit 80 ppb Ozon begast. Die Begasungsexperimente fanden im April 2013 im Gewächshaus des Departments für Agrikultur, Ernährung und Umwelt der Universität in Pisa statt. Im Unterschied zum vorherigen Jahr wurden die Blätter 3, 5, 12, 24 und 48 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode geerntet und bei -20 °C eingefroren. Außerdem gab es zu jedem Zeitpunkt Kontrollpflanzen, welche im Jahr davor aus logistischen Gründen fehlten. Bei allen durchgeführten Untersuchungen wurden pro Zeitpunkt jeweils Dreifachproben bestimmt und der Mittelwert berechnet.

2.5.12.1 Ascorbat/Dehydroascorbat-Gehalt

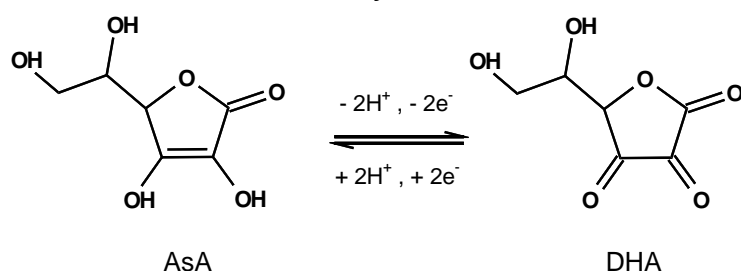


Abbildung 34: Ascorbat (AsA, reduziert, links) und das Oxidationsprodukt Dehydroascorbat (DHA, rechts)

Dieser Test basierte auf der Reduktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+} durch das Reduktionsmittel Ascorbat (siehe Abbildung 34) nach Wang und Jiao (2001). Der sich aus dem Fe^{2+} und den Stickstoffatomen des Bathophenanthrolins (4,7-Diphenyl-1,10-phenanthrolin) bildende Komplex (siehe Abbildung 35) wurde photometrisch bei 534 nm bestimmt. Der Gesamt-Ascorbat-Gehalt (DHA + AsA) wurde nach der Reduktion von Dehydroascorbat (DHA) zu Ascorbat (AsA) durch DTT gemessen. Der Gehalt an AsA und Gesamt-Ascorbat wurde mithilfe einer Kalibriergeraden, welche aus verschiedenen Konzentrationen (0-10 mM) einer Ascorbatlösung in 5%iger Trichloressigsäure (TCA) bestand, bestimmt. Der Gehalt an DHA wurde durch die Differenz des Ascorbats vom Gesamt-Ascorbat berechnet. Als Blindwert wurden 100 μl 5%ige TCA-Lösung (anstatt Extrakt) eingesetzt.

1,5 g der gefrorenen Blätter (-20 °C) wurden in flüssigem N_2 gemörser, in ein vorgekühltes Röhrchen gewogen, mit 12 ml eiskalter 5%iger TCA versetzt und bei 4 °C und 13000 g für 20 min zentrifugiert. Der farblose Extrakt wurde über ein Miracloth® Filtertuch filtriert und nach folgendem Schema verwendet:

| Ascorbat-Gehalt (AsA) | Gesamt-Ascorbat-(AsA+DHA) Gehalt |
|--|---|
| 100 μl Extrakt | 100 μl Extrakt |
| 650 μl Ethanol (96%) | 150 μl 3,89 mM DTT |
| | 350 μl Ethanol (96%) |
| | 10 min Inkubation |
| | 150 μl 0,24% N-Ethylmaleimid |
| 150 μl 20% TCA 150 μl 0,4% H_3PO_4 300 μl 0,5% Bathophenanthrolin 150 μl 0,03% FeCl_3 Inkubation bei 30 °C für 90 min → Bildung des Fe^{2+} -Bathophenanthrolin-Komplexes → photometrische Bestimmung bei 534 nm | |

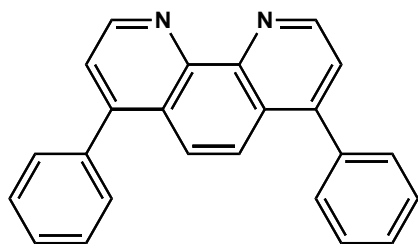
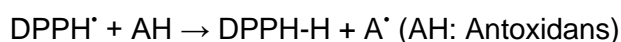


Abbildung 35: Bathophenanthrolin

2.5.12.2 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl Radikal (DPPH[•])-Test

Über den DPPH[•]-Test kann die Radikalfänger-Fähigkeit des Extrakts bestimmt werden.



Das dunkelviolettfarbene Radikal wird durch das Antioxidans reduziert und bei 517 nm photometrisch bestimmt (siehe Abbildung 36). Der DPPH[•]-Test wurde nach dem Protokoll von Benvenuti et al. (2004) durchgeführt und bestimmt die Radikalfänger-Effizienz von Polyphenolen. Die prozentuale Abnahme der Absorption wird für jede Konzentration bestimmt. Die prozentuale Minderung wurde durch folgende Gleichung bestimmt:

$$\text{IC}_{50} (\%) = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Extr}}) / A_{\text{DPPH}}] \times 100 \quad (A_{\text{Extr}} = \text{Absorption des Extrakts})$$

Die Radikalfänger-Aktivität wird als IC₅₀ (inhibition concentration) ausgedrückt, und dieser Wert drückt die Menge an Pflanzenmaterial (in mg) aus, die benötigt wird, um 50% der anfänglichen DPPH[•]-Konzentration zu reduzieren. 0,4 g der gefrorenen Blätter (-20 °C) wurden in flüssigem N₂ gemörsernt, in ein vorgekühltes Röhrchen gewogen, mit 4 ml 5%igem MeOH versetzt und bei 4 °C, 13000 g für 15 min zentrifugiert. Der grüne Extrakt wurde über ein Miracloth[®] Filtertuch filtriert, 1:5 verdünnt und nach folgendem Schema in Küvetten pipettiert:

| Extrakt (µl) | MeOH (µl) | 0,2 mM DPPH (µl) |
|---|-----------|------------------|
| 120 | 380 | 500 |
| 60 | 440 | 500 |
| 30 | 470 | 500 |
| Inkubation für 15 min im Dunkeln → photometrische Bestimmung bei 534 nm | | |

Als Blindwert wurde eine Mischung aus 500 µl der violettfarbenen reinen DPPH[•]-Lösung und 500 µl MeOH benutzt.

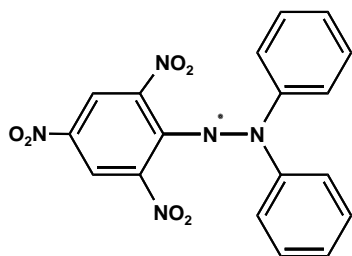


Abbildung 36: DPPH[•]-Radikal

2.5.12.3 H₂O₂-Gehalt

Es gibt eine Reihe von Fluorogenen, welche als Wasserstoffdonatoren fungieren und mithilfe der Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase = HRP) intensiv fluoreszierende Produkte bilden können (Tarpley und Grisham 2004). Die meist verwendeten Substrate sind Diacetyldichloro-Fluorescein (Hinkle et al. 1967), Homovanillinsäure (Ruch et al. 1983) und Amplex[®] Red (Zhou et al. 1997). Die Menge an H₂O₂ korreliert mit der Menge an gebildetem Produkt Resorufin. Hier wurde die fluorimetrische Wasserstoffperoxidbestimmung mit dem Amplex[®] Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Kit (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) nach Shin et al. (2005) durchgeführt. Der Assay basiert auf der Oxidation des Amplex[®] Red Reagenz (10-Acetyl-3,7-Dihydrophenoxazin) durch H₂O₂ in Anwesenheit von HRP und der Bildung des rot-fluoreszierenden Produkts (siehe Abbildung 37; Mohanty et al. 1997; Zhou et al. 1997).

0,18 g der gefrorenen Blätter (-20 °C) wurden in flüssigem N₂ gemörsernt, in ein vorgekühltes Röhrchen gewogen, mit 400 µl 20 mM KP_i-Puffer pH 6,5 versetzt und bei 4 °C, 12000 g für 20 min zentrifugiert. Der orangefarbene Extrakt wurde über ein Miracloth[®] Filtertuch filtriert. 50 µl des 1:5 verdünnten Überstands wurden mit 50 µl 50 µM 10-Acetyl-3,7-Dihydrophenoxazin und 50 µl 0,1 U/ml HRP bei 25 °C für 30 min im Dunkeln inkubiert (siehe Angaben des Herstellers). Die Resorufinfluoreszenz (Extinktion/Emission = 530/590 nm) wurde mit einem Fluoreszenz/Absorptions-Mikroplattenleser (Victor 3 1420 Multilabel Counter, Perkin Elmer, USA) quantifiziert. Nach dem Subtrahieren der Hintergrundfluoreszenz, welche durch die Pufferlösung und das Testreagenz verursacht wird, wurden die Werte mithilfe einer H₂O₂-Standardkurve (0-10 µM) berechnet.

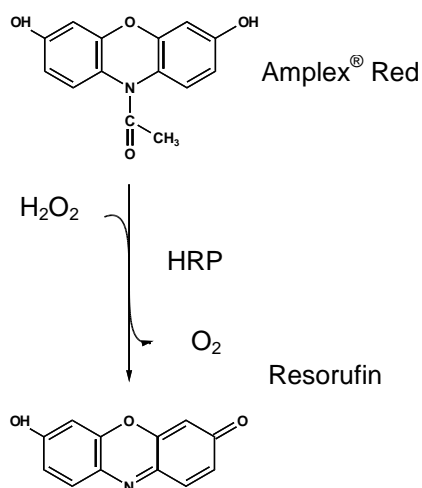
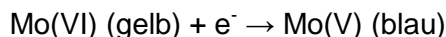
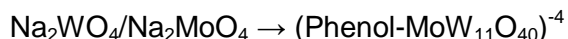


Abbildung 37: Oxidation des Amplex[®] Red Reagenz durch H₂O₂ in Anwesenheit von HRP (horseradish peroxidase = Meerrettichperoxidase) und der Bildung von Resorufin

2.5.12.4 Gesamtgehalt phenolischer Verbindungen

Der Gesamtgehalt an phenolischen Substanzen wurde mithilfe des Folin-Ciocalteau-Reagenzes spektrophotometrisch nach Singleton und Rossi (1965) und Waterhouse (2002) bestimmt. Die Originalreaktion wurde 1927 von Folin entwickelt. Die Phenole werden in einer

Redoxreaktion mit Wolframat und Molybdat zu einem blauen Endprodukt umgesetzt, dessen Absorption bei 760 nm gemessen werden kann (Prior et al. 2005).



0,4 g der gefrorenen Blätter (-20 °C) wurden in flüssigem N₂ gemörser, in ein vorgekühltes Röhrchen gewogen, mit 4 ml MeOH, angesäuert mit 1% HCl 37%, versetzt und bei 4 °C, 12500 g für 15 min zentrifugiert. Der 1:5 verdünnte, grüne Extrakt wurde über ein Miracloth[®] Filtertuch filtriert. Der Gesamtgehalt an phenolischen Substanzen wurde mithilfe einer Gallussäure-Kalibriergeraden, welche aus verschiedenen Volumina einer 25 mg/ml Gallussäurelösung ermittelt wurde, bestimmt. Laut Protokoll wurden folgende Schritte durchgeführt:

| Menge (µl) | Lösung |
|---|--------------------------------------|
| 25 | Kalibrierlösung/Extrakt |
| 1225 | Aqua dest. |
| 125 | Folin-Ciocalteu-Reagenz |
| Schütteln, Inkubation für 8 min | |
| 375 | 7,5% Na ₂ CO ₃ |
| 250 | Aqua dest. |
| Inkubation für 2 h im Dunkeln bei Raumtemperatur → photometrische Bestimmung bei 760 nm | |

2.5.12.5 Prolin-Gehalt

0,6 g der gefrorenen Blätter (-20 °C) wurden in flüssigem N₂ gemörser, in ein vorgekühltes Röhrchen gewogen, mit 12 ml 3%iger 5-Sulfosalicylsäure, angesäuert mit 1% HCl 37%, versetzt und bei 4 °C, 13000 g für 15 min zentrifugiert. Der klare Extrakt wurde über ein Miracloth[®] Filtertuch filtriert. Um eine saure Ninhydrinlösung herzustellen, wurden 1,25 g Ninhydrin in 30 ml Eisessig, versetzt mit 20 ml 6 M H₃PO₄, unter Rühren in der Wärme gelöst. Es wurden in einem Reagenzglas 1 ml Filtrat, 1 ml der frisch hergestellten sauren Ninhydrinlösung und 1 ml Eisessig gemischt und bei 100 °C für eine Stunde im Wasserbad erhitzt. Die Reaktion wurde nach Ablauf der Stunde sofort im Eisbad beendet. Zu der Lösung gab man 2 ml Toluol und mischte für 20 s intensiv. Das rötliche Chromophor wurde mit der oberen wässrigen Phase abgehoben und dessen Absorption bei 520 nm bestimmt (Bates et al. 1973).

2.5.12.6 Bestimmung der Carotinoide

Die Carotinoide sind in der Bestimmung der photosynthetischen Pigmente enthalten und wurden auf die gleiche Weise gemessen (siehe Kapitel 2.5.3).

2.5.12.7 Katalase-Aktivität

0,6 g der gefrorenen Blätter (-20 °C) wurden in flüssigem N₂ gemörkert, in ein vorgekühltes Röhrchen gewogen, mit 12 ml 50 mM KP_i-Puffer pH 7,8 (enthält 1% Polyvinylpyrrolidon 10, MW = 10000 g/mol), versetzt und bei 4 °C, 12000 g für 15 min zentrifugiert (Lei et al. 2011). Der orangefarbene Extrakt wurde über ein Miracloth[®] Filtertuch filtriert und die Proteinkonzentration zunächst durch den Bradford-Test bestimmt. Dazu wurden 12 ml Aqua dest. mit 3 ml „Dye Reagent Concentrate“ (Bio-Rad, München) gemischt. Zu 1 ml dieser Lösung wurden 20 µl Extrakt/Puffer pipettiert und im 10-Sekunden-Takt gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm im 10-Sekunden-Takt bestimmt. Die Berechnung erfolgte mithilfe einer BSA-Kalibriergeraden (0,2-0,9 mg/ml).

Um die Aktivität der Katalase (EC 1.11.1.6) zu messen, wurden zunächst 60 ml 50 mM KP_i-Puffer pH 7,8 mit 60 µl 30%iger H₂O₂ versetzt. Von dieser Mischung gab man 770 µl in eine Küvette und pipettierte 30 µl Extrakt hinzu. Die Absorption wurde alle 30 s bei 240 nm bestimmt. Die Katalase-Aktivität wurde durch den Extinktionskoeffizienten von 394 mM⁻¹ cm⁻¹ berechnet.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Projekt 1: Versuche zur Kristallisation des CbRAS-Proteins

3.1.1 Ergebnisse zur Gewinnung von CbRAS-Proteinkristallen

In den folgenden Kapiteln werden die Versuche zur Gewinnung von Proteinkristallen der CbRAS dargestellt. Sander (2010) erzielte nach Aufreinigung aus inclusion bodies hochreines CbRAS-Protein mit N-terminalem 6x-His-tag in einer Endkonzentration von 7,5 mg/ml, welches jedoch nur in 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 nicht präzipitierte. Bei Kristallisationsansätzen mit einer Variante des Wizard I Screens No. 2 konnten kleine, dreidimensionale Kristalle identifiziert werden, welche aber nicht zu einem großen Kristall heranwuchsen.

Zunächst wurde die Expression des CbRAS-Proteins in den *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen getestet, um zu bestimmen, ob die CbRAS in inclusion bodies vorliegt.

3.1.1.1 Expression des CbRAS-Proteins in *E. coli* BL21(DE3)pLysS

Wurde die CbRAS unter Standardbedingungen in *E. coli* BL21(DE3)pLysS exprimiert (siehe Kapitel 2.1.3), so konnte in RAS-Aktivitätstests nach einer Reaktionszeit von 5 Minuten bei 30 °C eine Produktmenge pro Testansatz von 3,0 nmol und nach einer Reaktionszeit von 15 Minuten eine Produktmenge pro Testansatz von 3,9 nmol gemessen werden. Allerdings war die synthetisierte Proteinmenge nach der His-tag-Aufreinigung (siehe Kapitel 2.1.10) aus 100 ml Bakterienkultur zu gering (0,09 mg/ml), um sie auf einem SDS-Polyacrylamidgel sichtbar zu machen. Dieses Ergebnis bestätigte die Untersuchungen von Sander (2010), dass die CbRAS in inclusion bodies vorliegt. Durch Plasmidpräparation (siehe Kapitel 2.1.4) und anschließenden Restriktionsverdau mit *Nde*I und *Bam*HI (siehe Kapitel 2.1.5) konnte mithilfe einer Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 2.1.6) die Anwesenheit der gewünschten Fremd-DNA (1293 bp) in dem pET-15b-Vektor bestätigt werden.

Mit dem „Protein Refolding Kit“ der Firma Novagen wurde die Solubilisierung und Rückfaltung des CbRAS-Proteins aus inclusion bodies durchgeführt. Durch dieses Kit können die Proteine, welche als inclusion bodies in *E. coli* akkumulieren, solubilisiert werden.

3.1.1.2 Aufreinigung/Isolierung des CbRAS-Proteins aus inclusion bodies

Nach dem Solubilisierungsschritt mithilfe des alkalischen CAPS-Puffers in Kombination mit dem Detergens N-Lauroylsarcosin und DTT (IB Solubilization Buffer) wurde das Protein zur Rückfaltung in einen pH-neutralen Dialysepuffer (1× Dialysis Buffer) überführt. Nach der Rückfaltung wurden Standardenzymtests durchgeführt, um die RAS-Aktivität zu bestimmen, wobei Reaktionszeiten von 5, 15 und 30 min bei 30 °C verwendet wurden (siehe Kapitel 2.1.14). Die höchste Produktmenge pro Testansatz mit 15,1 nmol lag nach einer Inkubationszeit von 5 min vor (siehe Abbildung 38).



Abbildung 38: Vergleich der CbRAS-Aktivitäten nach einer Reaktionszeit von 5, 15 und 30 Minuten nach der Rückfaltung aus inclusion bodies

Nach der His-tag Aufreinigung (siehe Kapitel 2.1.10) des rückgefalteten Proteins, wurde mittels PD-10 Säulchen in 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 umgepuffert (siehe Kapitel 2.1.11). Die Elutionsfraktion hatte eine Proteinkonzentration von 0,268 mg/ml und eine spez. Aktivität nach einer Reaktionszeit von 15 min von 0,3596 mkat/kg. Außerdem wurde eine SDS-PAGE angefertigt (siehe Kapitel 2.1.17), um die Menge und Reinheit des Proteins zu bestimmen. Das folgende SDS-Gel (siehe Abbildung 39) zeigt die verschiedenen Proteinfractionen der CbRAS-His-tag-Aufreinigung.

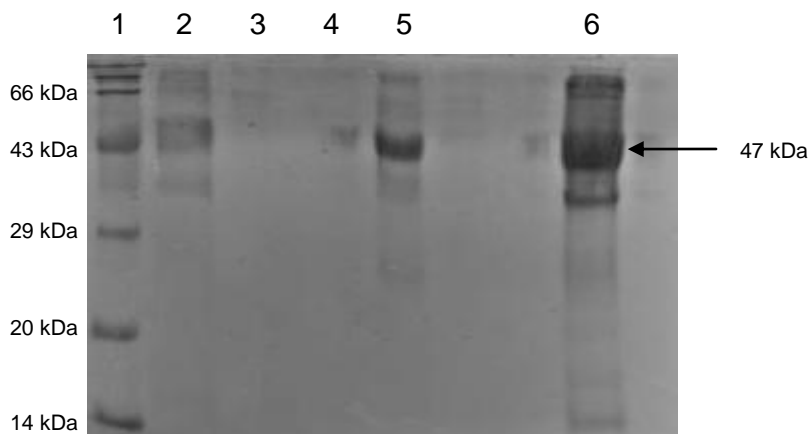


Abbildung 39: SDS-PAGE des CbRAS-Proteins nach Rückfaltung und His-tag-Aufreinigung aus inclusion bodies: 1: Roti[®]-Mark Standard, 2: Durchfluss, 3: 1. Waschfraktion, 4: 2. Waschfraktion, 5: Elutionsfraktion, 6: Rohextrakt

Um größere Mengen zu erzielen, wurden achtmal 250 ml LB-Amp-Medium mit je 1 ml ÜN-Kultur pro Kolben angeimpft und nach beschriebenem Verfahren bearbeitet (siehe Kapitel 2.1.3). Es wurden insgesamt vier Rohextrakte erzielt. Diese wiesen nach einer Reaktionszeit von fünf Minuten im RAS-Standardenzymtest (siehe Kapitel 2.1.14) spez. Aktivitäten zwischen 0,146 und 0,175 mkat/kg auf (siehe Abbildung 40).

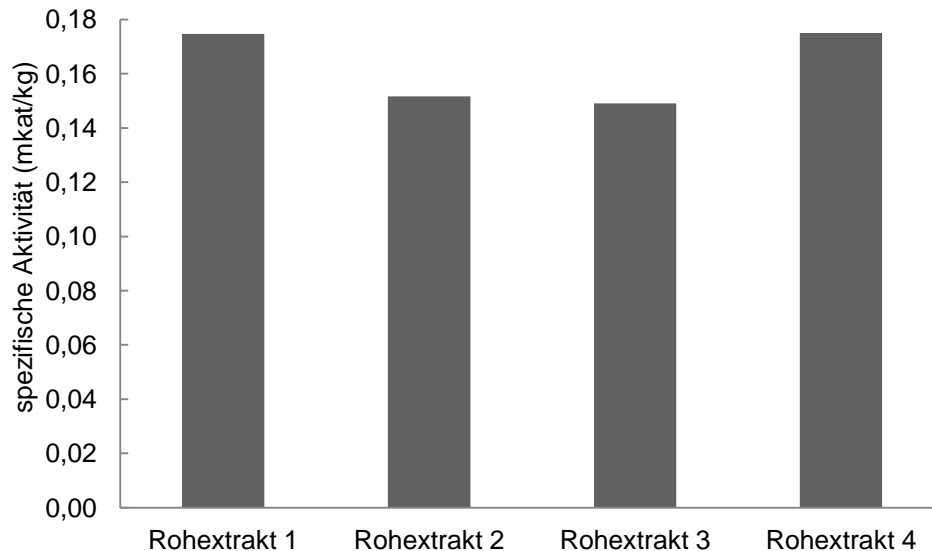


Abbildung 40: Vergleich der spez. RAS-Aktivität (mkat/kg) von vier verschiedenen Rohextrakten des CbRAS-Proteins aus inclusion bodies nach einer Reaktionszeit von fünf Minuten

Zur Optimierung von Menge und Reinheit der CbRAS wurde das rückgefaltete Protein aus Rohextrakt 1 (spezifische Aktivität von 0,175 mkat/kg) unter unterschiedlichen Bedingungen erneut solubilisiert und rückgefaltet (siehe Kapitel 2.1.9). Die deutlich geringere spezifische Aktivität ließ vermuten, dass noch eine gewisse Menge an CbRAS-Protein falsch gefaltet vorliegen könnte. Aus diesem Grund wurde versucht, durch die erneute Solubilisierung und Rückfaltung eine größere Menge an aktivem Protein zu erzielen. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden verschiedene Varianten angewandt.

3.1.1.3 Variationsmöglichkeiten zur Isolierung des CbRAS-Proteins aus inclusion bodies

Es wurden folgende Varianten getestet (siehe Kapitel 2.1.9):

- Aktivitätsbestimmung von Rohextrakt 1 nach Lagern bei +4 °C
- zweite Solubilisierung von Rohextrakt 1 mit **1x IB Solubilization Buffer**, 0,25 ml N-Lauroylsarcosin (30%), 50 µl 1 M DTT
- zweite Solubilisierung von Rohextrakt 1 mit **10x IB Solubilization Buffer**, 0,25 ml N-Lauroylsarcosin (30%), 50 µl 1 M DTT
- zweite Solubilisierung von Rohextrakt 1 mit **10x IB Solubilization Buffer** mit Zusatz von 4,5 M **Harnstoff**

- zweite Solubilisierung von Rohextrakt 1 mit 100 mM KH_2PO_4 pH 7,4, 100 mM **L-Arginin**

Wie in Abbildung 41 erkennbar ist, stieg die Aktivität des CbRAS-Proteins schon durch einmonatiges Lagern bei 4 °C um 291% von 0,175 mkat/kg auf 0,684 mkat/kg an. Die höchste Aktivität erhielt man bei der zweiten Solubilisierung mit 1x IB Solubilization Buffer auf 1,07 mkat/kg. Dies entspricht einer Steigerung um 511%. Fast keine Aktivität erhielt man bei der Verwendung mit 1x IB Solubilization Buffer in Kombination mit 4,5 M Harnstoff (0,063 mkat/kg). Mit Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) und Arginin konnte eine Steigerung um 58% erzielt werden (0,28 mkat/kg).

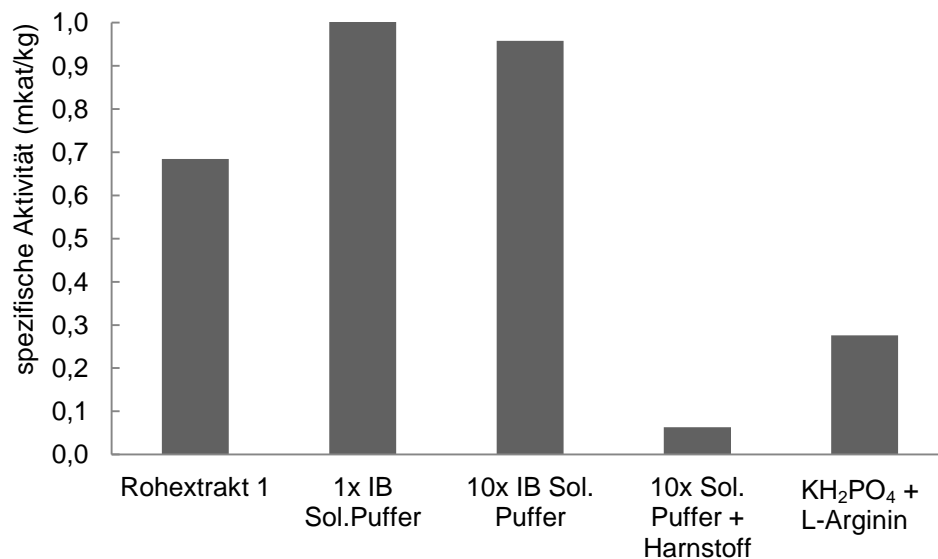


Abbildung 41: Vergleich der zweiten Solubilisierung von Rohextrakt 1 des CbRAS-Proteins aus inclusion bodies unter folgenden Bedingungen: Rohextrakt 1 nach einmonatiger Lagerung bei 4 °C, zweite Solubilisierung mittels 1x IB Solubilization Buffer, zweite Solubilisierung mittels 10x IB Solubilization Buffer, zweite Solubilisierung mittels 10x IB Solubilization Buffer + 4,5 M Harnstoff, zweite Solubilisierung mit 100 mM KH_2PO_4 + 100 mM L-Arginin

Um nicht nur die Aktivität, sondern auch die Reinheit des CbRAS-Proteins aus den einzelnen Varianten der zweiten Solubilisierung zu überprüfen, wurde eine SDS-PAGE (siehe Abbildung 42) angefertigt.

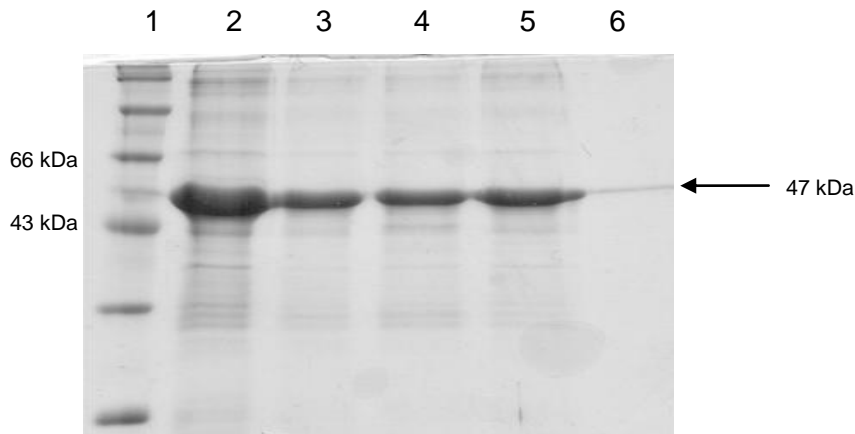


Abbildung 42: SDS-PAGE des CbRAS-Proteins aus der zweiten Solubilisierung von Rohextrakt 1 des CbRAS-Proteins aus inclusion bodies unter folgenden Bedingungen: 1: Roti[®]-Mark Standard, 2: Rohextrakt 1 des CbRAS-Proteins nach einmonatiger Lagerung bei 4 °C, 3: Zweite Solubilisierung von Rohextrakt 1 mit 1x IB Solubilization Buffer, 4: Zweite Solubilisierung von Rohextrakt 1 mit 10x IB Solubilization Buffer, 5: Zweite Solubilisierung von Rohextrakt 1 mit 10x IB Solubilization Buffer + 4,5 M Harnstoff, 6: Zweite Solubilisierung von Rohextrakt 1 mit 100 mM KH₂PO₄ + 100 mM L-Arginin

Man konnte deutlich eine bessere Reinheit (Banden 3, 4, 5 und 6) im Vergleich zur bloßen Lagerung bei 4 °C des Rohextrakts 1 (Bande 2) durch die zweite Solubilisierung erkennen. Um diese Reinheit noch zu steigern, wurde zusätzlich ein His-tag-Aufreinigungsschritt der zweiten Solubilisierung mit 1x IB Solubilization Buffer des Rohextrakts 1 angeschlossen. Dies ist in Abbildung 43 erkennbar.

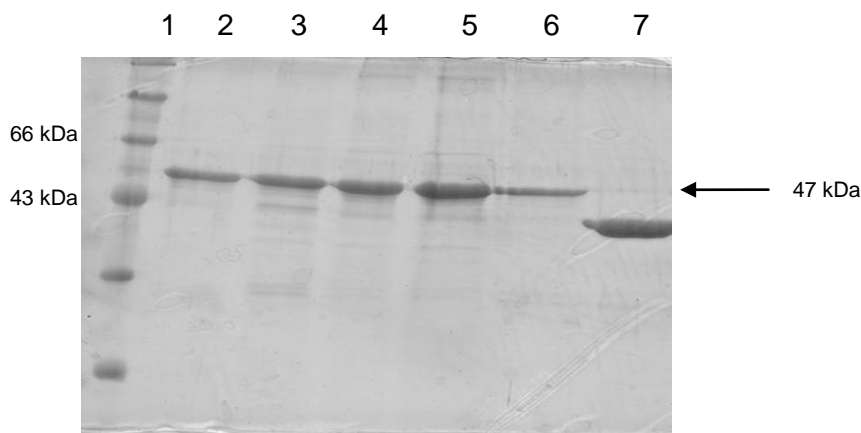


Abbildung 43: SDS-PAGE des CbRAS-Proteins aus inclusion bodies: 1: Roti[®]-Mark Standard, 2: Zweite Solubilisierung von Rohextrakt 1 mit 1x IB Solubilization Buffer, 3: Zweite Solubilisierung von Rohextrakt 1 mit 10x IB Solubilization Buffer, 4: Zweite Solubilisierung von Rohextrakt 1 mit 10x IB Solubilization Buffer + 4,5 M Harnstoff, 5: Rohextrakt 1, 6: Elutionsfraktion des Rohextrakts 1 nach zweiter Solubilisierung mit 1x IB Solubilization Buffer nach His-tag-Aufreinigung, 7: Ca9OMT

Durch die His-tag-Aufreinigung des Rohextrakts 1 nach der zweiten Solubilisierung in 1x IB Solubilization Buffer ist im Vergleich zwischen Bande 2 (vor His-tag-Aufreinigung) und Bande 6 (Elutionsfraktion, nach His-tag-Aufreinigung) eine Verbesserung der Reinheit erkennbar. Außerdem wurde eine Probe der erfolgreich kristallisierten Coniferylalkohol 9-O-Methyltransferase (Ca9OMT) neben der Elutionsfraktion aufgetragen, um einen Vergleich der Menge und Reinheit zu erhalten, welche für die Kristallisation vonnöten ist (Wolters et al. 2013). Die Aktivität der Elutionsfraktion (Reaktionszeit von fünf Minuten) betrug 2,22 mkat/kg.

Um zu bestimmen, ob sich die Aktivität noch weiter steigern ließ, wurde die Elutionsfraktion des Rohextrakts 1 nach der zweiten Solubilisierung mit 1x IB Solubilization Buffer nach His-tag-Aufreinigung noch zwei weitere Male mit 1x IB Solubilization Buffer solubilisiert (siehe Abbildung 44).

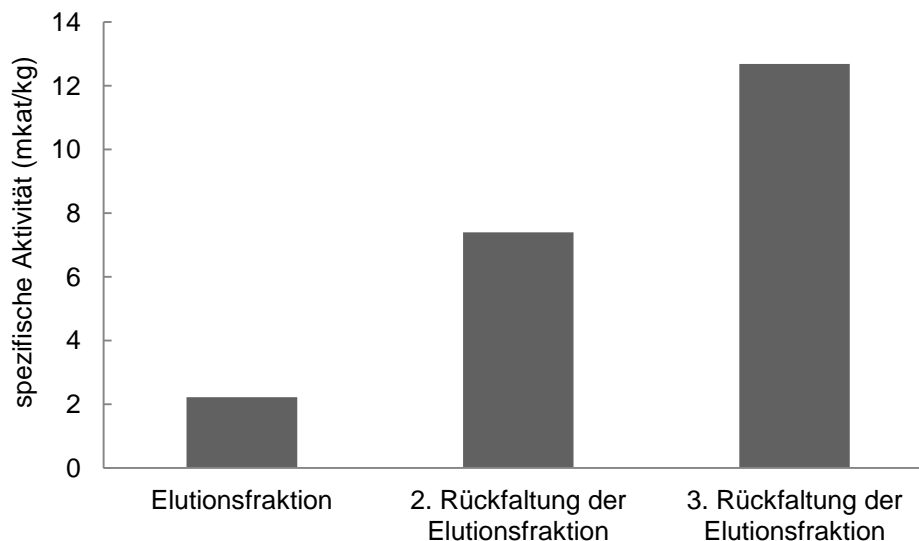


Abbildung 44: Vergleich der spezifischen Aktivität (Reaktionszeit von fünf Minuten) der Elutionsfraktion des Rohextrakts 1 des CbRAS-Proteins aus inclusion bodies nach der zweiten Solubilisierung mit 1x IB Solubilization Buffer mit den Aktivitäten (Reaktionszeit von fünf Minuten) der zweiten und dritten Solubilisierung der Elutionsfraktion durch 1x IB Solubilization Buffer

Es ist ersichtlich, dass eine enorme Steigerung der Aktivität um 471% von 2,22 mkat/kg auf 12,68 mkat/kg stattfand. Es war jedoch anzunehmen, dass bei dieser geringen Aktivität immer noch eine ziemlich große Menge an CbRAS falsch gefaltet vorliegt. Die Gefahr bei der Kristallisation besteht darin, dass falsch gefaltetes Protein kristallisiert. Aus diesem Grund wurden mit dieser Elutionsfraktion noch keine Kristallisierungsversuche unternommen.

3.1.1.4 PAGE unter nativen Bedingungen

Um zu untersuchen, ob verschiedene Proteinpopulationen von CbRAS vorlagen, wurde eine PAGE unter nativen Bedingungen durchgeführt (siehe Kapitel 2.1.18).

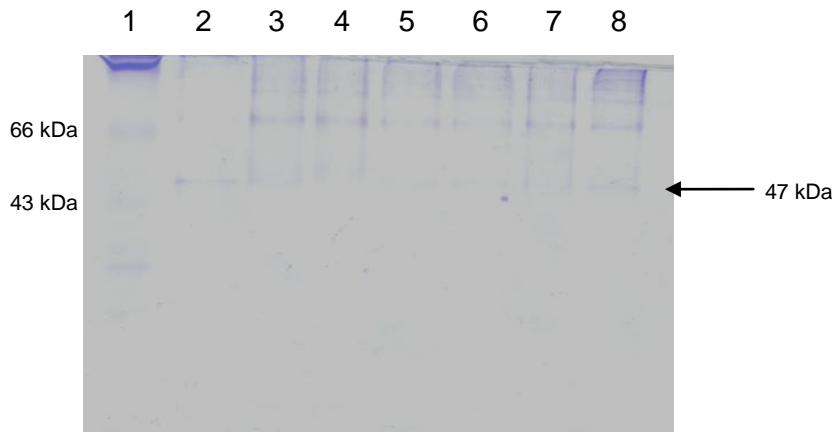


Abbildung 45: PAGE unter nativen Bedingungen: 1: Roti[®]-Mark Standard, 2: Rohextrakt 1 des CbRAS-Proteins aus inclusion bodies, 3: Zweite Solubilisierung von Rohextrakt 1 mittels 1x IB Solubilization Buffer, 4: Zweite Solubilisierung von Rohextrakt 1 mittels 10x IB Solubilization Buffer, 5 und 6: Elutionsfraktionen nach His-tag-Aufreinigung der zweiten Solubilisierung von Rohextrakt 1 mittels 1x IB Solubilization Buffer, 7: Zweite Solubilisierung von Rohextrakt 1 mittels 1x IB Solubilization Buffer, 8: Rohextrakt 1

Alle Proteinfraktionen sahen vergleichbar aus (siehe Abbildung 45). Es konnten keine unterschiedlich gefalteten Proteinpopulationen aufgetrennt werden.

Deshalb wurde die Strategie gewechselt und das Ziel verfolgt, direkt lösliches Protein mit hoher Aktivität und hoher Reinheit durch Verwendung der SoluBL21TM-*E. coli*-Zellen zu exprimieren.

3.1.1.5 Expression der CbRAS in SoluBL21TM Competent *E. coli*

Da in den vorherigen Kapiteln gezeigt wurde, dass ein großer Teil der CbRAS in inclusion bodies vorliegt, wurde versucht, durch die chemisch kompetenten SoluBL21TM *E. coli*-Zellen die Löslichkeit der CbRAS zu erhöhen (siehe Kapitel 2.1.21). Durch spezifische Selektionskriterien bildet der SoluBL21TM-Stamm uncharakteristische Mutationen aus, wodurch er unlösliches Protein in vollständiger oder teilweise löslicher Form exprimieren kann (Angaben des Herstellers).

Der Versuch, nach der Transformation mit dem Expressionsplasmid Übernachtskulturen mit M9-Minimalmedium (siehe Kapitel 7.3.3) anzuziehen, resultierte jedoch in äußerst geringem Wachstum. Da auch nach dem Animpfen mit den ÜN-Kulturen wuchsen die Bakterien extrem langsam, wurde auf LB-Medium (siehe Kapitel 7.3.1) umgestellt.

3.1.1.6 Optimierte Expression der CbRAS in SoluBL21TM Competent *E. coli*

3.1.1.6.1 Expression in 100 ml LB-Medium

Nach dem Bakterienaufschluss (siehe Kapitel 2.1.21.1) konnte der gewonnene Rohextrakt für die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (siehe Kapitel 2.1.12), für die SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.1.17) und für RAS-Enzymtests (siehe Kapitel 2.1.14). verwendet werden.

Nach der Expression und His-tag-Aufreinigung wurden aus 100 ml Bakteriensuspension 2,1 mg reines Protein mit einer spezifischen RAS-Aktivität von 1,8 mkat/kg erzielt. Die Reinheit wurde mittels SDS-PAGE (siehe Abbildung 46) überprüft.

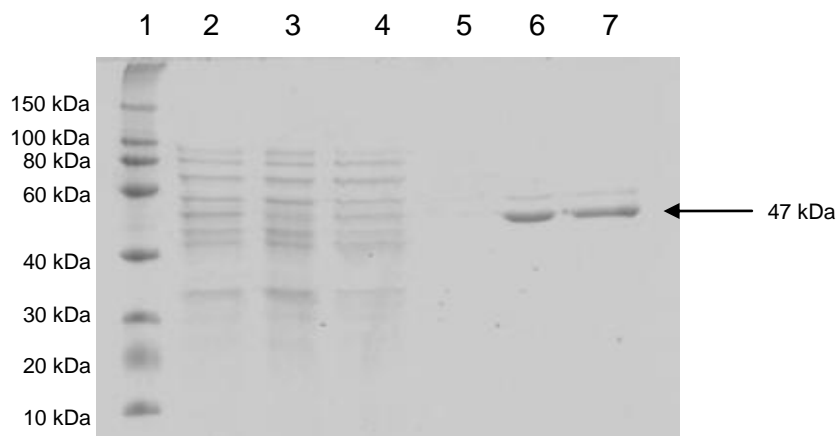


Abbildung 46: SDS-PAGE des in SoluBL21TM-Zellen exprimierten CbRAS-Proteins aus 100 ml Bakteriensuspension: 1: Roti[®]-Mark Plus, 2: Rohextrakt, 3: Durchfluss, 4: Waschfraktion 1, 5: Waschfraktion 2, 6 und 7: Elutionsfraktionen nach His-tag-Aufreinigung

Um die maximale spezifische Aktivität der heterolog exprimierten CbRAS zu ermitteln, wurden verschiedene Konzentrationen (unverdünnt, 1:10-, 1:50-Verdünnung) der Elutionsfraktion aus 100 ml Bakteriensuspension getestet (siehe Abbildung 47).

3.1.1.6.2 Bestimmung der maximalen spezifischen Aktivität des CbRAS-Proteins

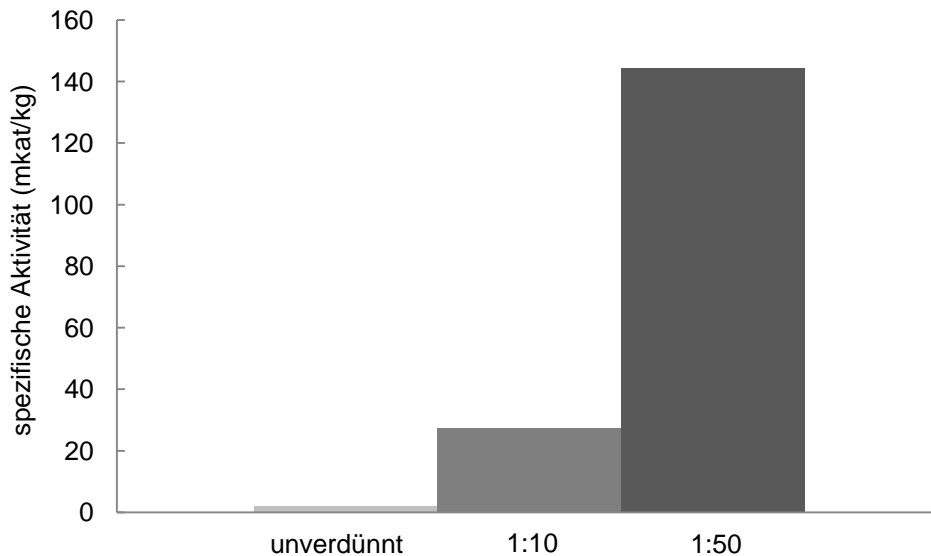


Abbildung 47: Bestimmung der maximalen spezifischen Aktivität CbRAS-Elutionsfraktion (Expression in SoluBL21TM-Zellen und His-tag-Aufreinigung) durch verschiedene Konzentrationen bei einer Reaktionszeit von fünf Minuten

Die höchste spezifische Aktivität mit 144,4 mkat/kg lag bei einer 1:50 Verdünnung vor. Dies zeigt, dass bei den anderen Verdünnungsstufen die Substrate nicht während der gesamten Reaktionszeit in ausreichender Konzentration vorlagen.

3.1.1.6.3 Expression in 1000 ml LB-Medium

Nach der Expression in einem größeren Maßstab (1 Liter LB-Amp-Medium) konnten 13,35 mg reines Protein pro 1000 ml Bakteriensuspension erzielt werden. Die Reinheit wurde ebenfalls mittels SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.1.17) überprüft. Wie in Abbildung 48 erkennbar ist, waren die Elutionsfraktionen immer noch stark mit Bakterienproteinen verunreinigt. Die spezifische Aktivität der 1:100 verdünnten Elutionsfraktion betrug nach 30 s 220,1 mkat/kg und nach 15 s 353,6 mkat/kg.

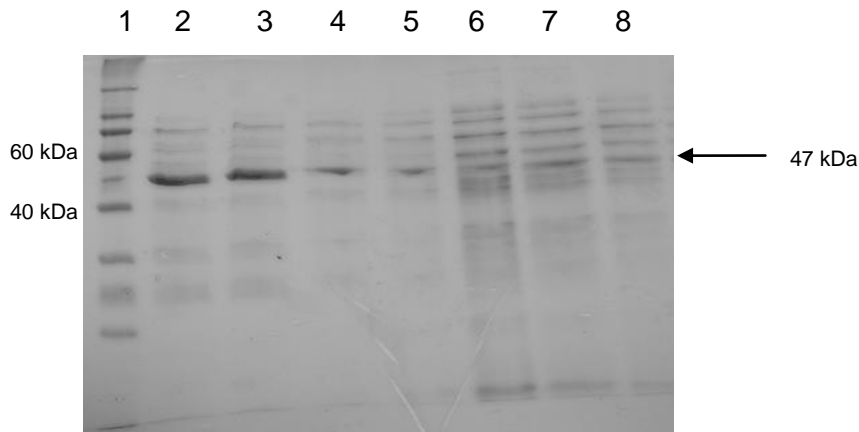


Abbildung 48: SDS-PAGE des in SoluBL21TM-Zellen exprimierten CbRAS-Proteins aus 1000 ml Bakteriensuspension: 1: Roti[®]-Mark Plus, 2 und 3: Elutionsfraktionen nach His-tag-Aufreinigung, 4: Elutionsfraktion 1:10 verdünnt, 5: Elutionsfraktion 1:100 verdünnt, 6: Waschfraktion 2, 7: Waschfraktion 1, 8: Durchfluss

Um mehr Fremdprotein schon bei dem Waschvorgang zu entfernen, wurden verschiedene Imidazol-Konzentrationen im Waschpuffer getestet.

3.1.1.7 Veränderung der Imidazol-Konzentration des His-tag-Waschpuffers

Es wurden Waschvorgänge mit Imidazol-Konzentrationen von 20, 50, 75, 100 und 150 mM durchgeführt und das Ergebnis über SDS-PAGE überprüft (siehe Abbildung 49).

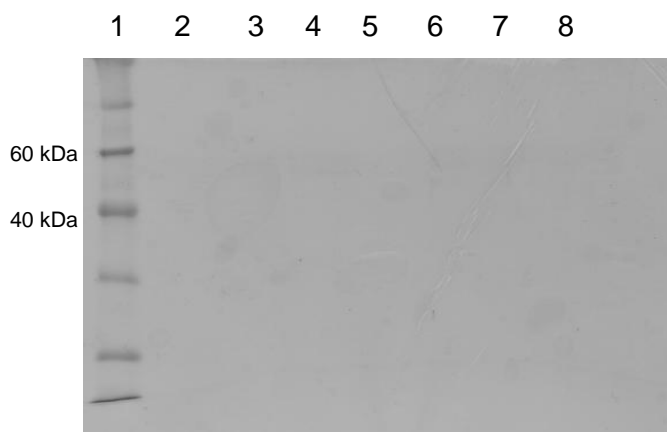


Abbildung 49: SDS-PAGE zur Untersuchung des Einflusses des Imidazolgehalts des Waschpuffers bei der His-tag-Aufreinigung nach CbRAS-Expression in SoluBL21TM-Zellen: 1: Roti[®]-Mark Plus, 2: Rohextrakt, 3: Durchfluss, 4: 20 mM Imidazol, 5: 50 mM Imidazol, 6: 75 mM Imidazol, 7: 100 mM Imidazol, 8: 150 mM Imidazol

Die Proteinkonzentrationen waren viel zu gering, um durch die SDS-PAGE detektiert zu werden. Aus diesem Grund wurden die Proben mit Trichloressigsäure (TCA, trichloroacetic acid) gefällt.

Nach dem Fällern mit TCA (siehe Kapitel 2.1.23) wurde das Pellet gewaschen, getrocknet, in 20 mM Tris/HCl pH 7,5 zurückgelöst und mittels SDS-PAGE analysiert (siehe Abbildung 50).

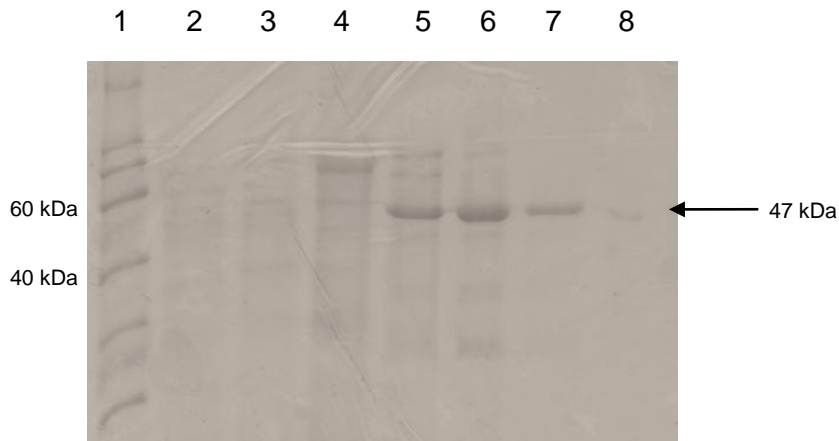


Abbildung 50: SDS-PAGE zur Untersuchung des Einflusses des His-tag-Waschpuffers bei der His-tag-Aufreinigung nach CbRAS-Expression in SoluBL21TM-Zellen; das Protein wurde vor der Elektrophorese durch TCA-Fällung aufkonzentriert: 1: Roti[®]-Mark Plus, 2: Rohextrakt, 3: Durchfluss, 4: 20 mM Imidazol, 5: 50 mM Imidazol, 6: 75 mM Imidazol, 7: 100 mM Imidazol, 8: 150 mM Imidazol

Am saubersten sahen die Fraktionen mit 75 und 100 mM Imidazol (Banden 6 und 7) im Waschpuffer aus. Deshalb wurde eine His-tag-Aufreinigung an die CbRAS-Expression durch SoluBL21TM-*E. coli* angeschlossen und nach dem zweimaligen Waschen mit 20 mM Imidazol und der Elution mit 75 und 100 mM Imidazol im Waschpuffer die Reinheit mittels SDS-PAGE untersucht (siehe Abbildung 51).

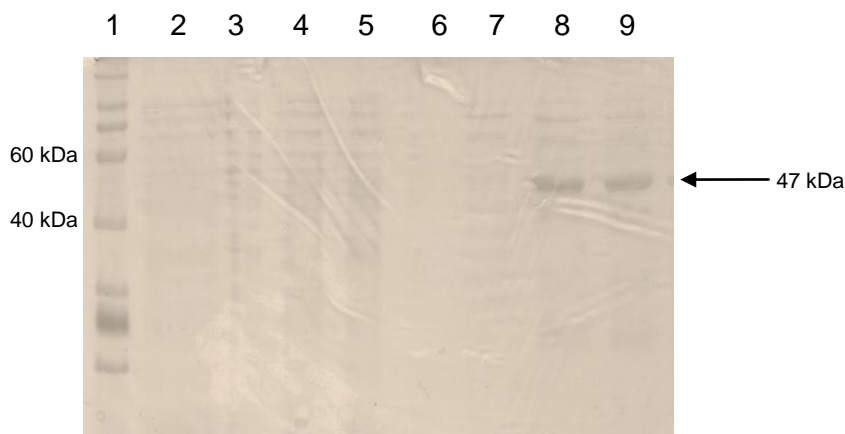


Abbildung 51: SDS-PAGE zur Untersuchung des Einflusses der Imidazolkonzentration des Waschpuffers bei der His-tag-Aufreinigung nach CbRAS-Expression in SoluBL21TM-Zellen: 1: Roti[®]-Mark Plus, 2: Gesamtprotein vor Induktion, 3: Gesamtprotein nach Induktion, 4: Rohextrakt, 5: Durchfluss, 6: Waschfraktion 1: 20 mM Imidazol, 7: Waschfraktion 2: 20 mM Imidazol, 8: Elutionsfraktion: 75 mM, 9: Elutionsfraktion: 100 mM

Wie in Abbildung 51 erkennbar ist, machte es keinen großen Unterschied, ob mit 75 oder 100 mM Imidazol im Waschpuffer eluiert wird. Trotzdem sind immer noch Verunreinigungen mit Fremdproteinen erkennbar. Somit wurde eine Reinigung des CbRAS-Proteins durch Gel-permeationschromatographie angeschlossen (siehe Kapitel 3.1.1.9).

3.1.1.8 Reinigung des Proteins durch Gelpermeationschromatographie

3.1.1.8.1 GPC Säule HiLoad™ 26/60 Superdex 200

Nach der CbRAS-Expression in SoluBL21™-*E. coli* (siehe Kapitel 3.1.1.6.3) erfolgte nach dem Bakterienaufschluss eine His-tag-Aufreinigung (siehe Kapitel 2.1.10). Nach dem Aufkonzentrieren mit Vivaspin 20 Zentrifugalkonzentratoren (siehe Kapitel 2.1.16) konnten 3 ml Lösung mit einer Protein-Endkonzentration von 2,26 mg/ml erzielt werden (siehe Kapitel 2.1.12).

Danach wurde eine präparative Gelfiltrationschromatographie mittels einer HiLoad™ 26/60 Superdex 200-Säule (siehe Abbildungen 52 und 53) angeschlossen. Die einzelnen, gesammelten Fraktionen wiesen ein Volumen von 10 ml auf.

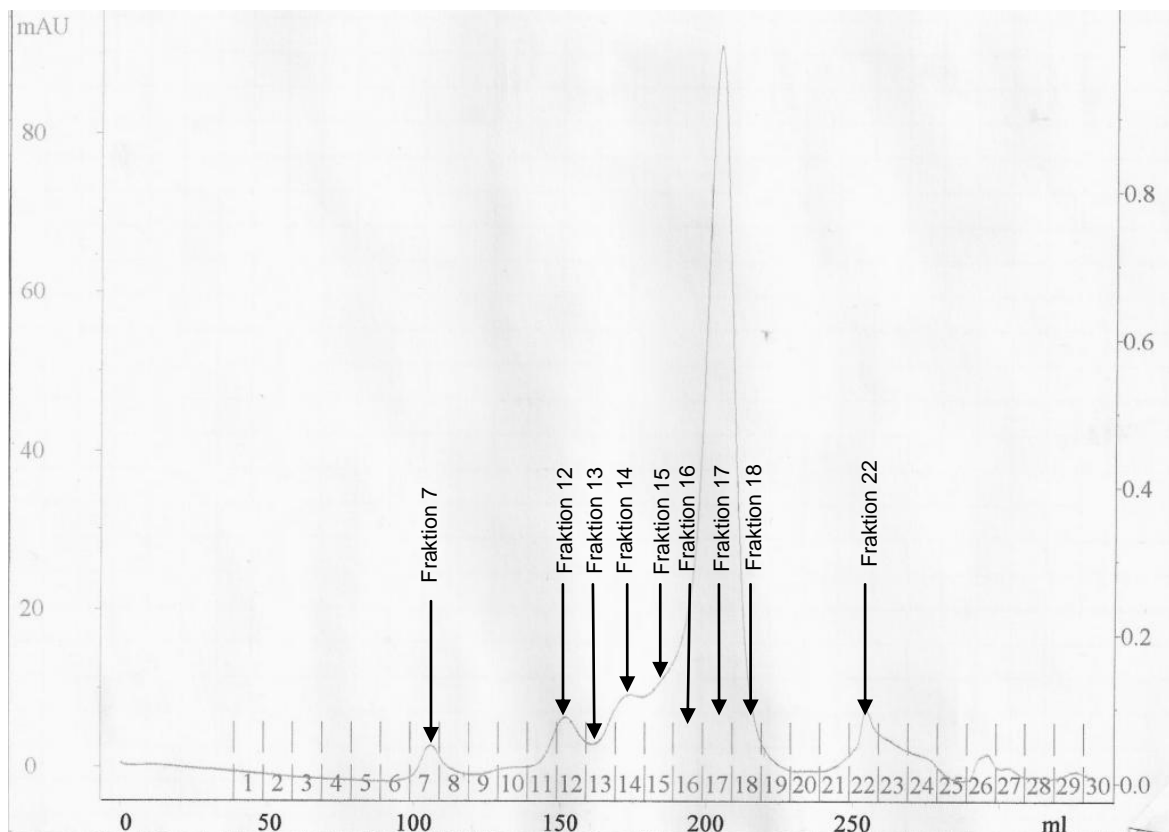


Abbildung 52: Präparative Gelfiltrationschromatographie: Chromatogramm der HiLoad™ Superdex 200-Säule nach CbRAS-Expression in SoluBL21™-Zellen und His-tag-Aufreinigung, Pfeile zeigen einzelne, gesammelte Fraktionen mit einem Volumen von je 10 ml

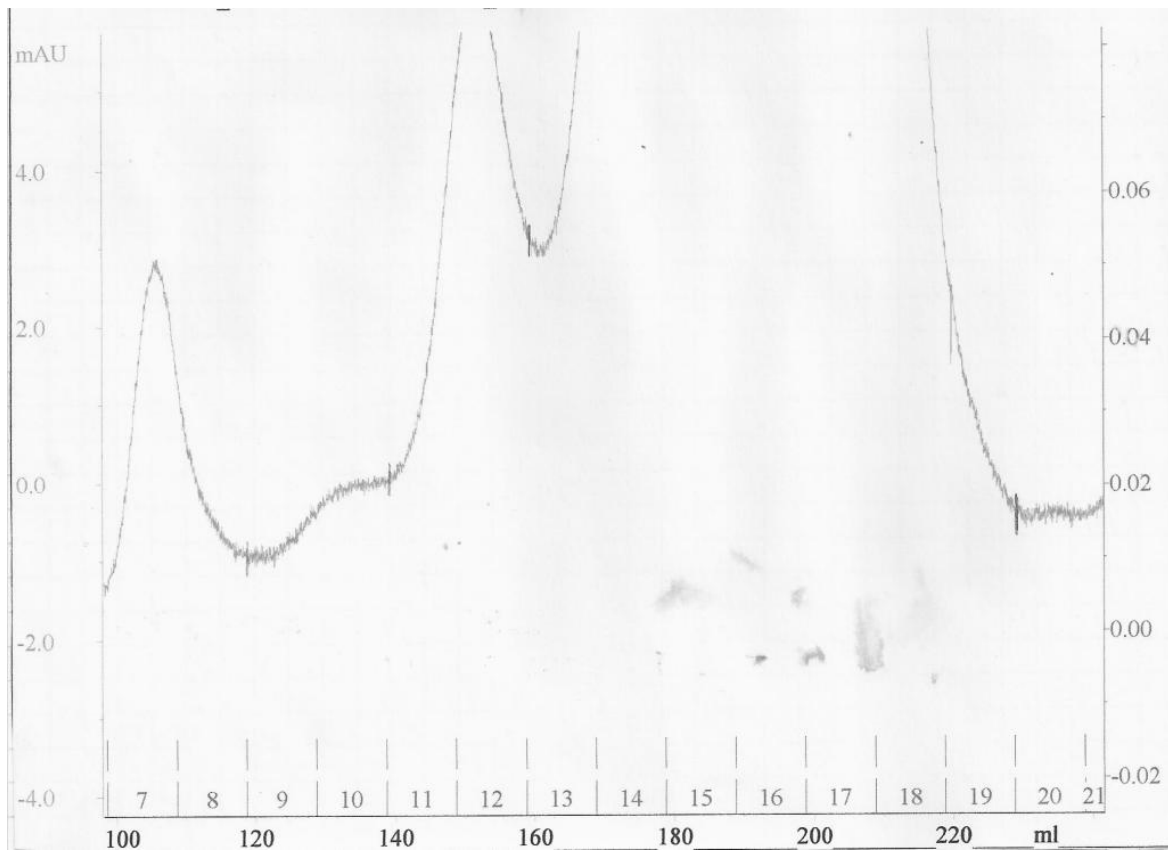


Abbildung 53: Präparative Gelfiltrationschromatographie: Chromatogramm der HiLoad™ Superdex 200-Säule nach CbRAS-Expression in SoluBL21™-Zellen und His-tag-Aufreinigung, detailliertere Darstellung

Da die Fraktionen 7, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 und 22 (schwarze Pfeile in Abbildung 52) möglicherweise das CbRAS-Protein enthalten, wurden sie per SDS-PAGE auf Identität und Reinheit untersucht (siehe Abbildung 54).

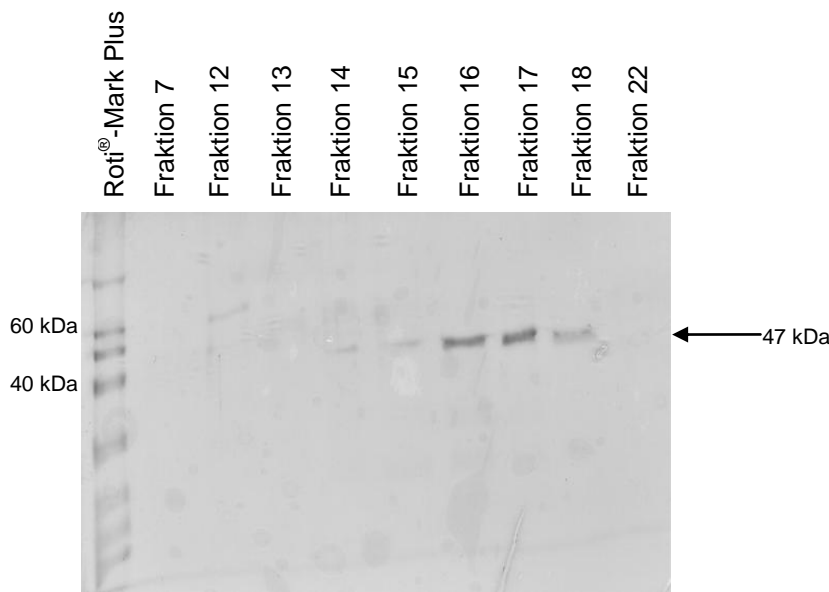


Abbildung 54: SDS-PAGE zur Untersuchung der Fraktionen nach HiLoad™ Superdex 200-Gel-permeationschromatographie nach CbRAS-Expression in SoluBL21™-Zellen

Das CbRAS-Protein war in den Fraktionen 14, 15, 16, 17 und 18 detektierbar (siehe Abbildung 54). Da die Fraktionen 16 und 17 die größte Reinheit und Menge aufwiesen, wurden sie vereinigt (Konzentration: 1,195 mg/ml), mithilfe der Vivaspin 20 Zentrifugalkonzentratoren auf 8,216 mg/ml aufkonzentriert und die Reinheit mittels SDS-PAGE kontrolliert (siehe Abbildung 55).

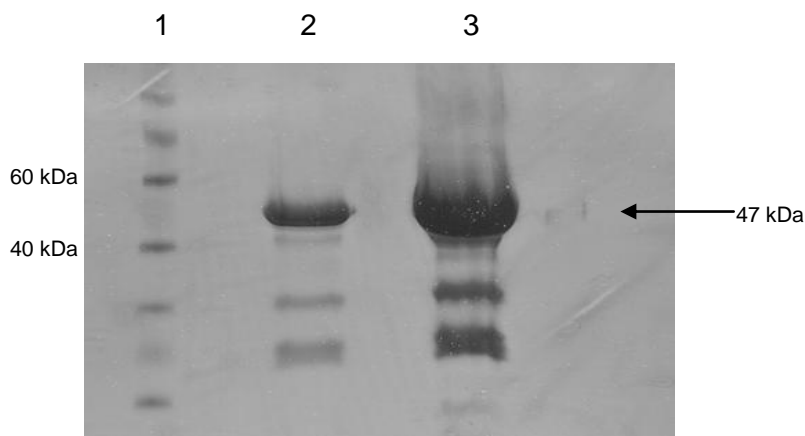


Abbildung 55: SDS-PAGE zur Untersuchung der aufgereinigten Fraktionen nach HiLoad™ Superdex 200-Gelpermeationschromatographie nach CbRAS-Expression in SoluBL21™-Zellen: 1: Roti®-Mark Plus, 2: vereinigte Fraktionen (Fraktionen 16 und 17) vor Aufkonzentrierung durch Vivaspin 20 Zentrifugalkonzentratoren (Konzentration: 1,195 mg/ml), 3: vereinigte Fraktionen (Fraktionen 16 und 17) nach Aufkonzentrierung durch Vivaspin 20 Zentrifugalkonzentratoren (Konzentration: 8,216 mg/ml)

Das aufkonzentrierte Protein war immer noch stark mit Fremdproteinen verunreinigt. Demzufolge wurde eine weitere Aufreinigung mit der HiLoad™ 26/60 Superdex 75-Säule (siehe Abbildungen 56 und 57) angeschlossen.

3.1.1.8.2 GPC Säule HiLoad™ 26/60 Superdex 75

Das jeweilige Fraktionsvolumen wurde von 10 ml auf 1,5 ml verringert, um eine größere Reinheit der einzelnen Fraktionen zu gewährleisten. Die „großen“ Fraktionen wurden weiterhin mit einem Volumen von 10 ml gesammelt (siehe Abbildungen 56 und 57).

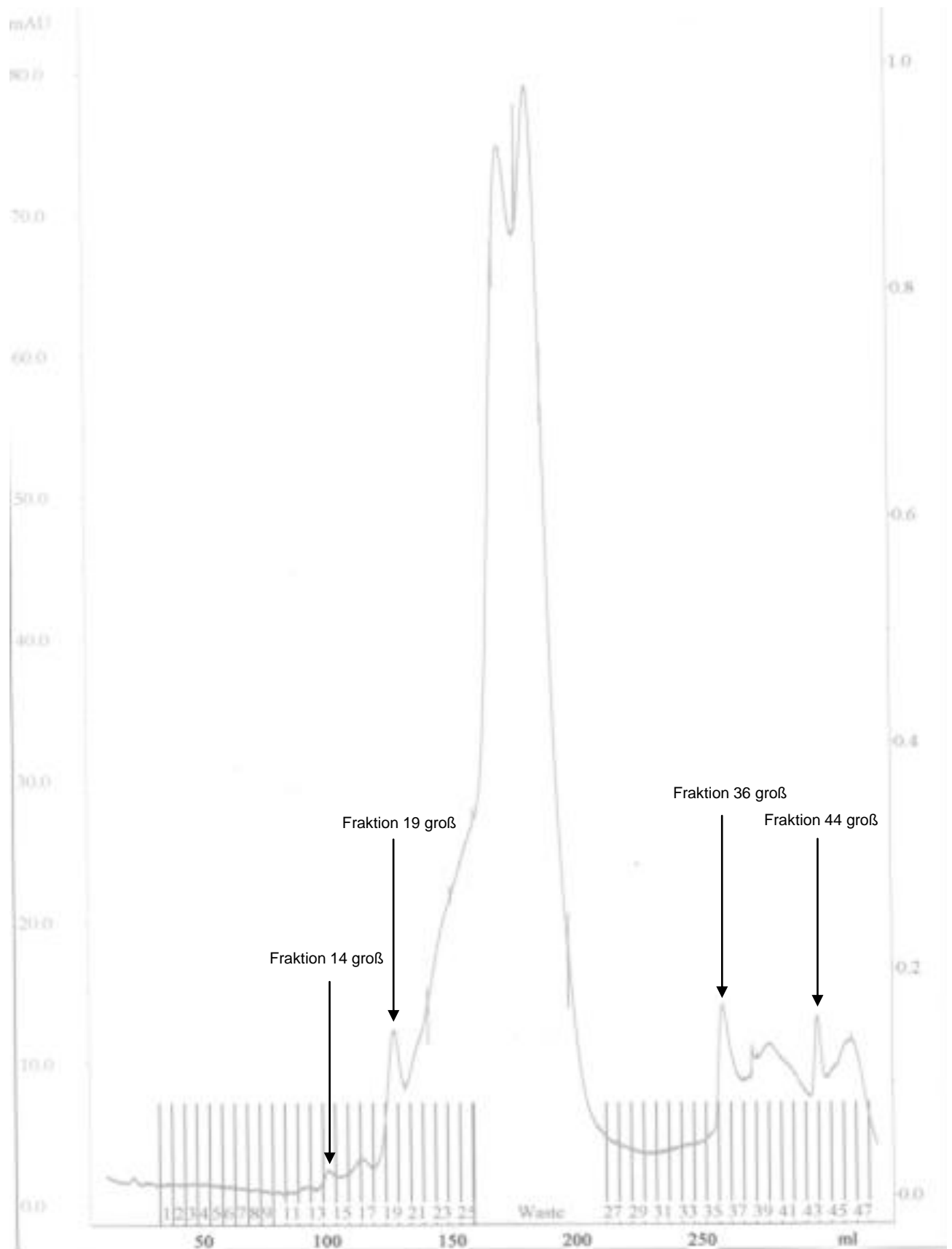


Abbildung 56: Präparative Gelfiltrationschromatographie, Chromatogramm der HiLoad™ Superdex 75-Säule nach CbRAS-Expression durch SoluBL21™-Zellen und His-tag-Aufreinigung, Pfeile zeigen gesammelte Fraktionen mit einem Volumen von 10 ml an

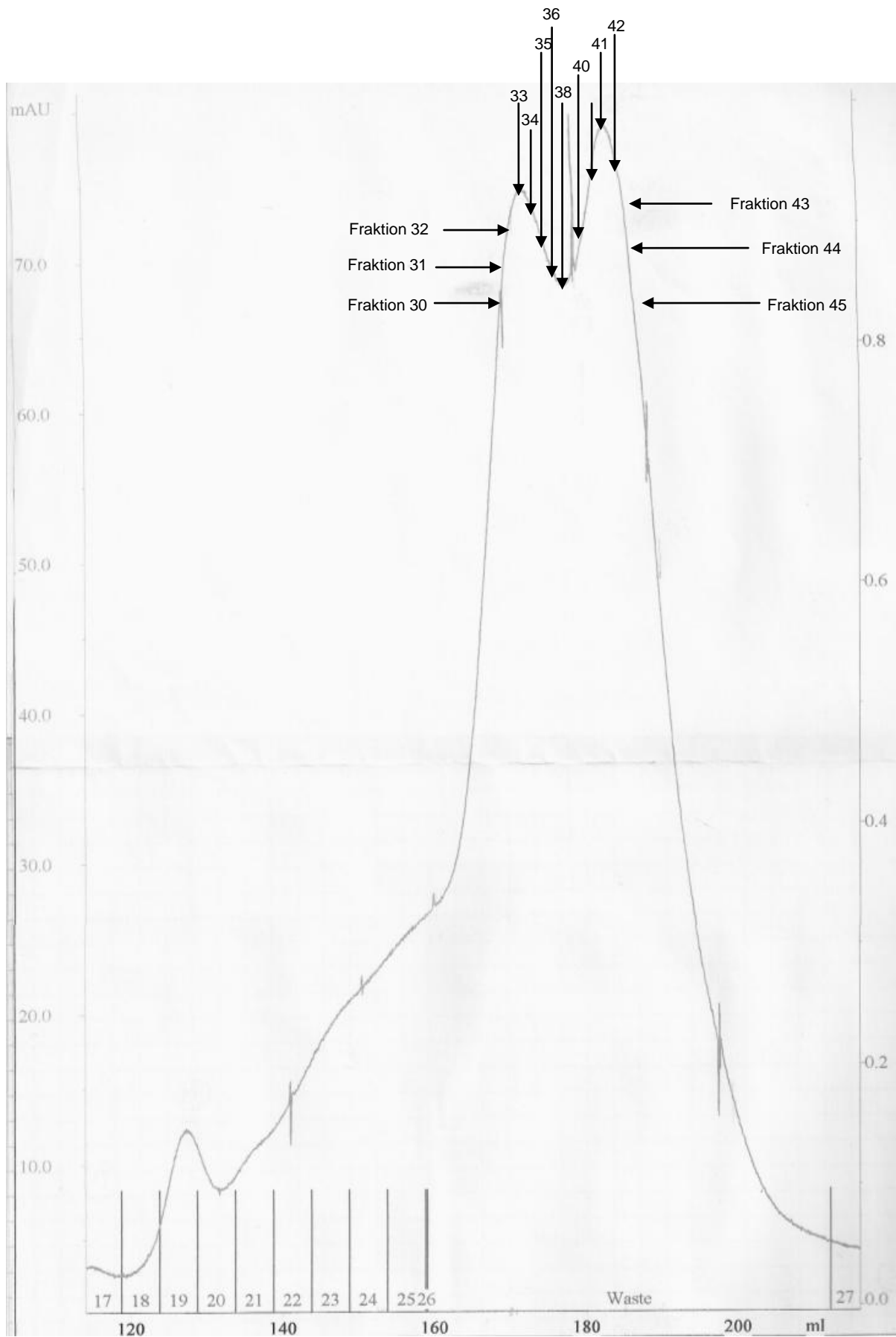


Abbildung 57: Präparative Gelfiltrationschromatographie, Chromatogramm der HiLoad™ Superdex 75-Säule nach CbRAS-Expression durch SoluBL21™-Zellen und His-tag-Aufreinigung, Pfeile zeigen die gesammelten Fraktionen mit einem Fraktionsvolumen von 2 ml an, detailliertere Darstellung

Da, wie in Abbildungen 56 und 57 erkennbar, zwei Peaks vorhanden sind, wurden die verschiedenen Fraktionen von Peak 1 und die Fraktionen von Peak 2 auch getrennt über zwei SDS-PAGEs analysiert (siehe Abbildung 58).

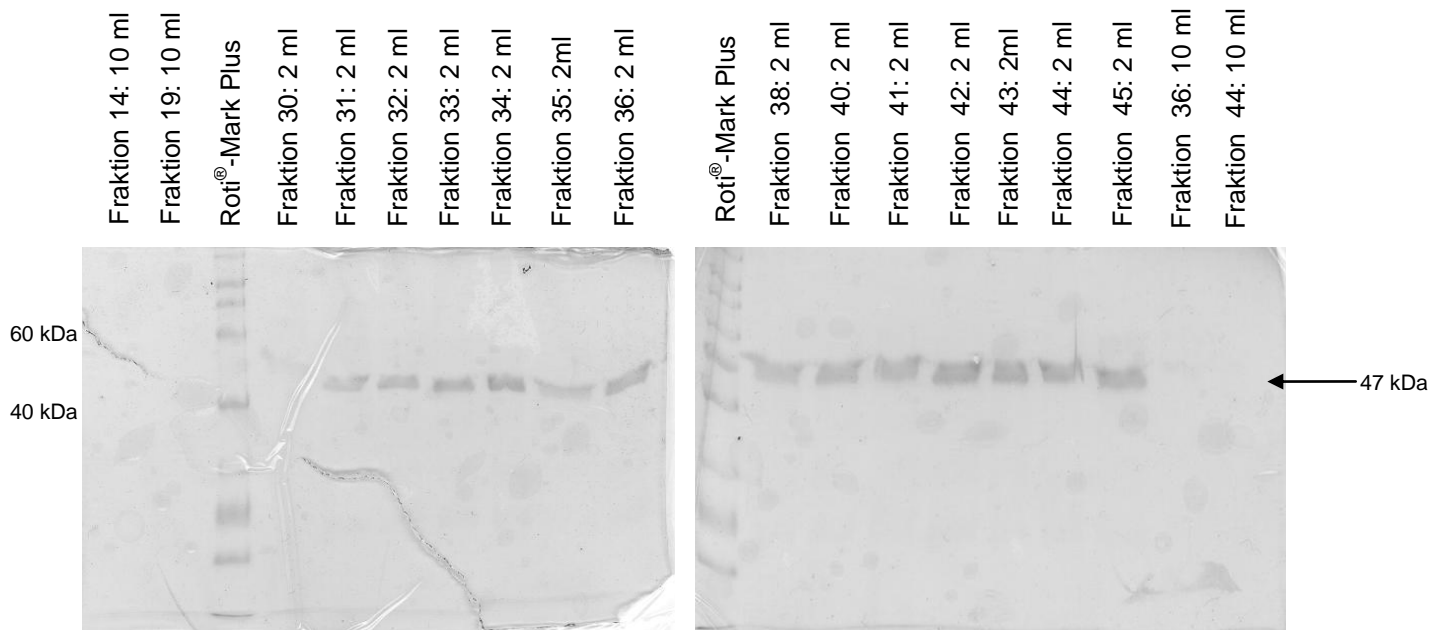


Abbildung 58: SDS-PAGEs zur Untersuchung der gesammelten 2 ml- und 10 ml-Fractionen nach HiLoad™ Superdex 75-Gelpermeationschromatographie nach CbRAS-Expression durch SoluBL21™-Zellen

Wie in der Abbildung 58 erkennbar ist, ist zwischen den einzelnen 2 ml-Fractionen, die das Protein enthalten, kein Unterschied auszumachen. Demzufolge wurden diese Fraktionen (Fraktion 31-45) wieder vereinigt und mithilfe der Vivaspin 20 Zentrifugalkonzentratoren aufkonzentriert. Die Reinheit wurde erneut mittels SDS-PAGE untersucht (siehe Abbildung 59).

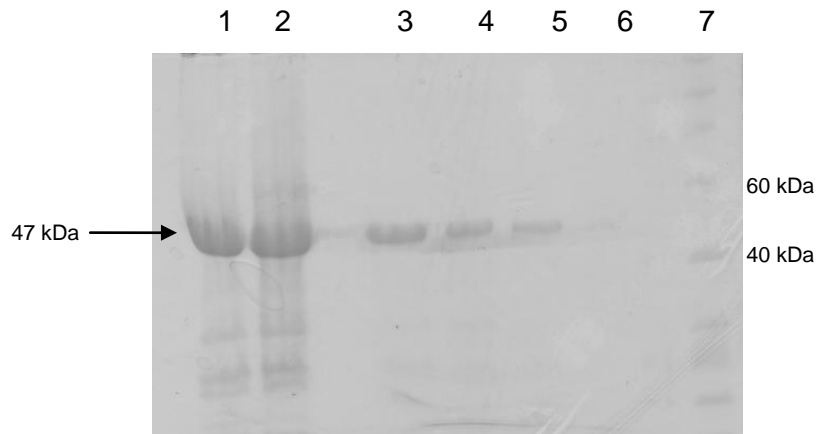


Abbildung 59: SDS-PAGE zur Untersuchung der vereinigten Fraktionen nach HiLoad™ Superdex 75-Gelpermeationschromatographie nach CbRAS-Expression durch SoluBL21™-Zellen: 1: CbRAS der vereinigten Fraktionen von Peak 1 (Fraktion 31-36), 2: CbRAS der vereinigten Fraktionen von Peak 2 (Fraktion 38-45) 3;5: verschiedene Konzentrationen der vereinigten Fraktionen von Peak 1, 4;6: verschiedene Konzentrationen der vereinigten Fraktionen von Peak 2, 7: Roti®-Mark Plus

Die aufkonzentrierten Fraktionen von Peak 1 (400 µl; 3,05 mg/ml) und 2 (200 µl; 6,31 mg/ml) wurden ebenfalls vereinigt. Nach einer erneuten Aufkonzentrierung erhielt man 300 µl Proteinlösung mit einer Konzentration von 8,871 mg/ml.

Um die Aktivität des Proteins zu testen, wurde ein Standard-Enzymassay (siehe Kapitel 2.1.14) durchgeführt. Das Protein wurde 1:100 verdünnt (siehe Kapitel 3.1.1.6.2), da die CbRAS eine sehr hohe spezifische Aktivität aufweist. Die spezifische RAS-Aktivität bei einer Reaktionszeit von 15 s betrug 12552 mkat/kg.

Mit dieser extrem aktiven, sauberen Proteinfraktion wurden nach den „in-house-screens“ (nicht über Gelpermeationschromatographie aufgereinigt), die als Vorversuche dienten, Kristallisationsversuche mit dem Kristallisationsroboter Cartesian Microsys™ SQ4000 (siehe Abbildung 20) gestartet.

3.1.1.9 Kristallisationsversuche

Um unterschiedliche Bedingungen zu analysieren, wurden zuerst sogenannte „in-house-screens“ durchgeführt und das „sitting-drop“ Verfahren angewandt (siehe Kapitel 2.1.25). An die CbRAS-Expression durch SoluBL21™-*E. coli* wurde eine His-tag-Aufreinigung angeschlossen und nach dem zweimaligen Waschen mit 20 mM Imidazol mit 75 mM Imidazol eluiert. Die Elutionsfraktion hatte eine Proteinkonzentration von 5,12 mg/ml und eine spezifische Aktivität von 368,14 mkat/kg. Folgende „in-house-screens“ wurden untersucht: Hampton Crystal Screen, Wizard I und II und Cryo I und II. Da in den von Hand pipettierten Screens keinerlei Kristalle heranwuchsen, wurde der Kristallisationsroboter Cartesian Microsys™ SQ4000 (siehe Abbildung 20) verwendet.

Dafür wurde das durch die GPC Säule HiLoad26/60 Superdex 75 hochgereinigte Protein mit einer spezifischen Aktivität von 12552 mkat/kg (siehe oben) verwendet. Der Roboter pipettierte exakt 200 nl der Proteinlösung und 200 nl der Pufferlösung pro well. Es wurden gleichzeitig eine hohe Proteinkonzentration mit 8,8 mg/ml und eine geringere Proteinkonzentration mit 4,4 mg/ml getestet.

Hier wurde ebenfalls das „sitting-drop“ Verfahren angewandt. Pro Platte standen 96 verschiedene Bedingungen zur Verfügung. Es wurden folgende Kits der Firma Qiagen verwendet: JCSG Core Suite I/II/III; PACT Suite, JCSG+ Suite und Classics Suite. Bei der Bedingung JCSG Core III, Lösung 9; Puffer: 0,1 M Bicin, 5% PEG 6000, pH 9,0 wuchs ein kleiner Kristall heran (siehe Abbildung 60). Nach der Anfärbung mit „Iziti Crystal Dye“, wurde jedoch klar, dass es sich um einen Salzkristall handeln musste. „Iziti Crystal Dye“ ist ein kleines Molekül, welches in die Kanäle („solvent channels“) in einem Protein penetrieren kann und es blau färbt. Salzkristalle besitzen kleinere Kanäle, in die der Farbstoff nicht eindringen kann (Angaben des Herstellers).

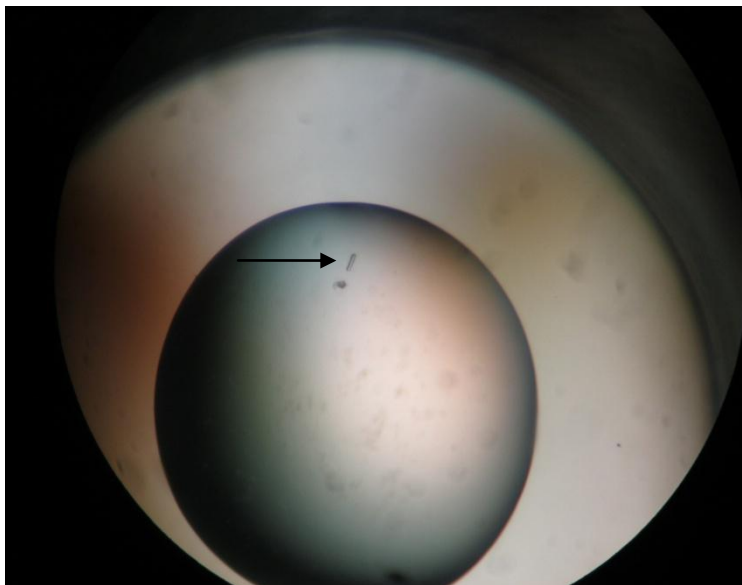


Abbildung 60: Salzkristall bei Verwendung des JCSG Core III, Lösung 9; Puffer: 0,1 M Bicin, 5% PEG 6000, pH 9,0 bei einem Kristallisationsversuch des CbRAS-Proteins

Um die Bedingung (0,1 M Bicin, 5% PEG 6000, pH 9,0) weiter zu variieren, wurden PEG-Konzentrationen von 3-6% und außerdem ein pH-Wert in einem Bereich von 8,8-9,2 eingesetzt. Auch die Verwendung von 8-20%igen PEG 6000-Lösungen bei einem pH-Wert von 9,0 führte zu keinem Ergebnis. Um den Einfluss der Temperatur zu testen, wurden die Platten bei 4, 18 und 25 °C gelagert, was jedoch auch nicht zur Bildung weiterer Proteinkristalle führte.

3.1.1.10 Abspaltung des His-tags

Da sich der His-tag möglicherweise störend auf die Kristallisation auswirken könnte (Sander 2010), wurde mithilfe des Clean CleavageTM-Kits (siehe Kapitel 2.1.26) versucht, den Fusions-tag abzuspalten.

Der Rohextrakt wurde unter Standardbedingungen gewonnen (siehe Kapitel 2.1.21) und über His-tag routinemäßig aufgereinigt (siehe Kapitel 2.1.10). Nach Umpuffern mit dem 1x Clean Cleavage Buffer und Aufkonzentrieren auf 1 ml lag die Proteinkonzentration nach der Bradford-Bestimmung (siehe Kapitel 2.1.12) bei 1 mg/ml.

Um den His-tag-Rest abzuspalten, inkubierte man das Protein mit 1x Clean Cleavage Buffer bei Raumtemperatur unter sanftem Schütteln. Aliquots wurden nach 1, 2, 4, 6 und 24 h entnommen, kurz zentrifugiert und der Überstand durch SDS-PAGE (siehe Abbildung 61) analysiert.

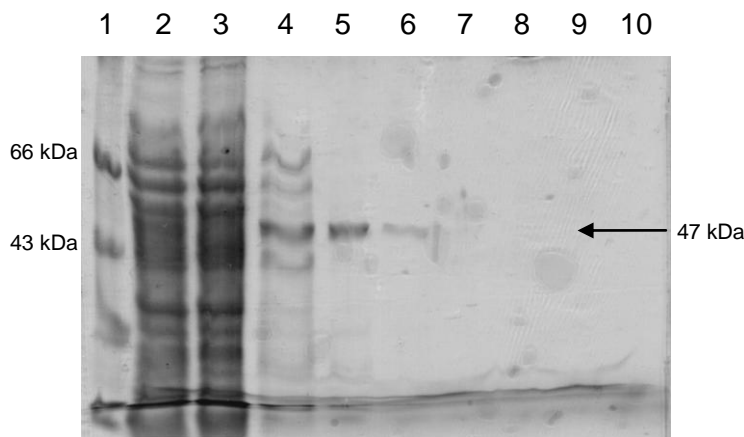


Abbildung 61: SDS-PAGE zur Kontrolle der His-tag-Abspaltung von dem CbRAS-Protein mit dem Clean CleavageTM-Kit: 1: Roti[®]-Mark Standard, 2: Rohextrakt, 3: Durchfluss, 4: Waschfraktion, 5: aufkonzentrierte Elutionsfraktion (1 mg/ml), 6: Inkubation mit Thrombin für 1 h, 7: Inkubation mit Thrombin für 2 h, 8: Inkubation mit Thrombin für 4 h, 9: Inkubation mit Thrombin für 6 h, 10: Inkubation mit Thrombin für 24 h

Da es zu einem Ausfallen des Proteins und somit zu einer Proteindetektion im Überstand nur nach einer Stunde kam, wurde versucht, durch Zugabe von DMSO die Löslichkeit zu erhöhen. Die Proben wurden nach 1, 2, 4, 6, 24, 33 und 72 h entnommen. Nach dem jeweiligen Abzentrifugieren der Thrombin-Agarose wurde auch das Pellet nach 72 h untersucht, um zu ermitteln, wie viel ungelöstes Protein sich noch im Sediment befand (siehe Abbildung 62).

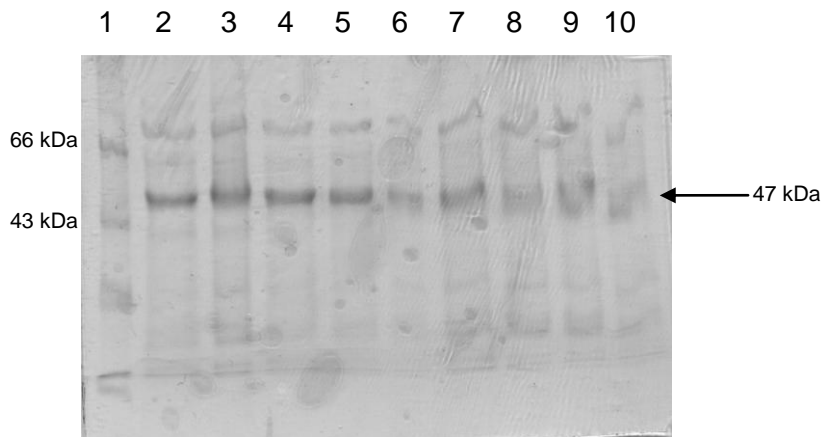


Abbildung 62: SDS-PAGE zur Kontrolle der His-tag-Abspaltung von dem CbRAS-Protein (+DMSO) mit dem Clean CleavageTM-Kit: 1: Roti[®]-Mark Standard, 2: aufkonzentrierte Elutionsfraktion (1 mg/ml) nach His-tag Aufreinigung, 3: Inkubation mit Thrombin für 1 h, 4: Inkubation mit Thrombin für 2 h, 5: Inkubation mit Thrombin für 4 h, 6: Inkubation mit Thrombin für 6 h, 7: Inkubation mit Thrombin für 24 h, 8: Inkubation mit Thrombin für 33 h, 9: Inkubation mit Thrombin für 72 h, 10: Pellet nach 72 h

Durch das DMSO wurde das Protein löslicher und fiel nicht mehr aus. Die Bande sollte sich nach dem Schneiden durch Thrombin eigentlich 1,5 kDa unterhalb der CbRAS-Bande befinden (<http://www.laborjournal.de/rubric/methoden/methoden/v49.lasso>). Wie in Abbildung 62 zu erkennen ist, konnte der His-tag wahrscheinlich nicht quantitativ abgespalten werden.

3.1.2 Diskussion der Versuche zur Gewinnung von CbRAS-Proteinkristallen

Ein Ziel dieser Arbeit war die Gewinnung der Rosmarinsäuresynthase in adäquater Qualität und Quantität sowie die Aufklärung der Kristallstruktur derselben mithilfe von Röntgenstrukturanalyse, um sie mit anderen Hydroxycinnamoyltransferasen vergleichen zu können. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden mehrere Verfahren angewandt. Da die CbRAS aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit bei der bakteriellen Expression hauptsächlich in inclusion bodies (siehe Kapitel 3.1.1.1) präzipitierte, wurde eine Solubilisierung und Rückfaltung des Proteins mithilfe des Refolding Kits der Firma Novagen durchgeführt (siehe Kapitel 3.1.1.2). Nach einmaliger, erfolgreicher Rückfaltung wurden verschiedene Bedingungen getestet, welche zu einer optimalen zweiten Rückfaltung führten (siehe Kapitel 3.1.1.3). Da das beste Ergebnis mit 1x IB Solubilization Buffer erzielt wurde, wurde dieses rückgefaltete Protein mit einer His-tag-Affinitätschromatographie aufgereinigt und noch zwei weitere Male mit 1x IB Solubilization Buffer solubilisiert und rückgefaltet. Es konnte eine Aktivitätssteigerung um 471,2% (von 2,22 mkat/kg auf 12,68 mkat/kg) erzielt werden (siehe Kapitel 3.1.1.3). Es ist jedoch anzunehmen, dass bei dieser Aktivität immer noch eine große Menge des Proteins falsch gefaltet bzw. inhomogen vorliegt. Deshalb wurde die Expression mit SoluBL21™-*E. coli* getestet. Hier konnten aus 1 Liter Bakterienkultur nach Aufreinigung durch Gelpermeationschromatographie über eine GPC HiLoad™ 26/60 Superdex 75-Säule 13,35 mg Protein mit einer Konzentration von 8,871 mg/ml und einer enorm hohen spezifischen Aktivität von 12552 mkat/kg erzielt werden (siehe Kapitel 3.1.1.9.2).

Im Vergleich mit den ersten veröffentlichten Kristallstrukturen von HCSQTs (Lallemant et al. 2012 a,b; Walker et al. 2013) sollte das CbRAS-Protein noch weiter aufkonzentriert werden. Bei der Kristallisation der HCSQT aus *Coffea canephora* (Lallemant et al. 2012 a,b) führten Proteinkonzentrationen zwischen 10 und 20 mg/ml und bei der HCSQT aus *Sorghum bicolor* (Walker et al. 2013) eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml zum Erfolg. Es ist jedoch wichtig anzumerken, dass die CbRAS hauptsächlich in dem 20 mM Tris-HCl Puffer pH 7,5 stabil ist und in salzhaltigen Puffern an Aktivität verliert (Sander 2010). Bei der Kristallisierung der SbHCSQT (Walker et al. 2013) lag das Protein in einem 20 mM Tris-Puffer pH 8,5 vor. Es könnte getestet werden, ob das CbRAS-Protein auch in diesem Puffer stabil ist und möglicherweise bei den gleichen Kristallisationsbedingungen (0,1 M MES Monohydrat, pH 6,0 und 22% (V/V) Polyethylenglykol 400; 4°C) kristallisiert.

3.1.2.1 Möglichkeiten zur Affinitätsmarkierung

Der Versuch, den His-tag-Rest abzuspalten gestaltete sich als schwierig, da die CbRAS in 1x Clean Cleavage Buffer schon nach einer Inkubationszeit von einer Stunde ausfiel und dadurch Thrombin den His-tag nicht mehr abspalten konnte (siehe Abbildung 62). Dies deckt sich auch mit den Beobachtungen von Sander (2010). Nach der Zugabe von DMSO blieb das Enzym zwar in Lösung, der His-tag-Rest konnte aber trotzdem nicht quantitativ durch Thrombin abgespalten werden. Dies könnte mehrere Ursachen haben: Möglicherweise befand sich nicht genügend Thrombin in der Suspension und die Menge des Thrombins und

die Applikationsdauer müssten noch weiter erhöht werden. Außerdem wäre es möglich, dass die Bedingungen nicht optimal für den Vorgang waren. Hier könnte man den pH-Wert verändern, die Temperatur auf $\geq 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhöhen, oder 1 M Harnstoff als Denaturierungsmittel hinzugeben (Angaben des Herstellers). Eine Abspaltung des His-tags könnte wahlweise auch mit einer TEV-Protease (Tobacco Etch Virus) oder auch mit dem Faktor Xa versucht werden (Waugh 2011).

Eine weitere Option wäre, einen GST-tag (Glutathion-S-Transferase) an das CbRAS-Protein anzuhängen, was schon von Sander (2010) versucht wurde. Das Protein war zwar aktiv, doch kam es zu keiner Überexpression, wodurch dieses Verfahren verworfen wurde.

In dem Übersichtsartikel (<http://www.laborjournal.de/rubric/methoden/methoden/v50.lasso>) wurden verschiedene Markierungsmethoden durch tags beschrieben: Neben dem GST- und His-tag gibt es noch diverse andere Methoden, ein Protein zu markieren: zu den kleinen tags (max. 12 AS) werden neben dem His-tag noch der Arg-tag, der Flag-tag und der Strep-tag gezählt. 1984 wurde das Arg-tag beschrieben. Da es sich bei Arginin um eine basische AS handelt, kann über die Kationen-Austauscher-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Ein C-terminales Arg-tag könnte jedoch die Tertiärstruktur des Proteins beeinflussen. Das Fusionsprotein wird in einem sauren pH-Wert eluiert, bei dem leider viele Proteine denaturieren. Der Flag-tag kann sowohl C- als auch N-terminal fusioniert werden, und es wird bei pH 3 oder mit 2-5 mM EDTA eluiert. Die Matrix besteht aus den immobilisierten Antikörpern M1, M2 und M5. Im Kern des Strep-tag-Peptids befindet sich eine Histamin-Prolin-Glutamin-Sequenz. Das tag bindet in der Biotin-Bindetasche des Streptavidins. Die Elution erfolgt mit 2,5 mM Desthiobiotin, danach kann das Material mit einem Azofarbstoff regeneriert werden (<http://www.laborjournal.de/rubric/methoden/methoden/v49.lasso>).

Mittelgroße tags weisen 13-60 AS auf, und zu dieser Gruppe gehören z.B. der S-tag, der HAT (Histidin Affinitäts-tag), das Calmodulin-Bindepeptid (CBP), das Chitin-Bindepeptid, sowie einige Cellulose-Bindepeptide, welche aber eher zu den großen tags zählen. Der S-tag bindet an das S-Fragment der RNase A. Da diese Bindung jedoch sehr stark ist, muss mit 3 M Guanidinthiocyanat oder 0,2 M Citrat pH 2 eluiert werden, was meist zu einer Denaturierung des Proteins führt. Dieser Affinitäts-tag ist somit nicht so gut für die Proteinaufreinigung, sondern eher zur Detektion geeignet. Der HAT eignet sich sehr gut für die Proteinaufreinigung, da er einen Poly-His-tag mit dazwischen gesetzten AS aufweist. Die Elution erfolgt mit 150 mM Imidazol. Das CBP bindet Calmodulin in Anwesenheit von 0,2 mM CaCl_2 , und die Elution erfolgt mit 2 mM EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraessigsäure). Dieses System eignet sich gut für die Expression in und die Aufreinigung aus Bakterien.

Maltose-Bindeprotein (MBP) ist mit 40 kDA der größte tag. Die Fusionsproteine binden an eine Amylose-Matrix und werden mit 10 mM Maltose eluiert. Allerdings besteht hier die Gefahr, dass während der Expression das MBP vom Zielprotein abgespalten oder proteolytisch verdaut wird. Die Abspaltung erfolgt mit Thrombin, Faktor Xa oder der TEV-Protease,

was jedoch oftmals einen Proteinausfall zur Folge hat (Waugh 2011; <http://www.laborjournal.de/rubric/methoden/methoden/v50.lasso>).

Für das CbRAS-Protein existieren verschiedene Möglichkeiten, um die Aufreinigung effektiver zu gestalten. Zum Beispiel ist der N-terminale Fusions-Strep-Tag® II der Firma Novagen zu nennen, welcher an das Strep-Taktin bindet und dadurch eine sanftere Elution erlaubt. Bei kleineren tags ist die Gefahr der Konformationsänderung des Proteins deutlich geringer (Rehm und Letzel 2010). Das Protein kann in dem pET-15b-Vektor mit dem Strep-tag exprimiert und mit der TEV-Protease wieder abgespalten werden (Miladi et al. 2011). Das „Molecular Modelling“ einer Hydroxycinnamoyltransferase, der HCSQT aus Artischocke erfolgte mittels eines rekombinanten S-tag-Fusionsproteins (Sonnante et al. 2010). Eine andere Möglichkeit wäre der HAT der Firma Clontech mit dem Polyhistidin-Epitop über die TALON IMAC Resin-Aufreinigung, dafür müsste das CbRAS-Protein allerdings in den pHAT20 Vektor umklontiert werden. Durch eine Enterokinase könnte das Protein dann wieder abgespalten werden. Auch könnte die Proteinexpression mit dem MBP versucht werden. Er hat jedoch mit 40 kDa einen sehr großen Rest, und es müsste festgestellt werden, ob die CbRAS als aktives Protein exprimiert wird oder in inclusion bodies vorliegt. Um einem Proteinausfall bei der Abspaltung mit der TEV-Protease vorzubeugen, müsste DMSO zugesetzt werden (Waugh 2011). Dennoch besteht die Möglichkeit, dass das lösliche CbRAS-Protein, ebenso wie bei dem GST-tag, durch den viel größeren Rest nicht überexprimiert werden würde und ein großer Teil immer noch in inclusion bodies vorliegt (Sander 2010). Hier könnte man einen „Double-tag“ versuchen: eine Kombination aus MBP mit kleinen Affinitäts-tags. Hier wird das Protein noch einem zweiten Affinitätsreinigungsschritt unterworfen (<http://www.laborjournal.de/rubric/methoden/methoden/v50.lasso>). Dennoch besteht bei solch großen tags die Gefahr, dass das Protein nicht kristallisieren kann, da sie die Löslichkeit verringern. Deshalb müssten diese tags auf jeden Fall wieder abgespalten werden.

3.1.2.2 Kristallisationsversuche von Hydroxycinnamoyltransferasen

Hoffmann et al. gelang (2003) die Isolierung einer HCSQT (AJ507825.1) aus dem Stängel von *Nicotiana tabacum*, welche für die Bildung von CA und Lignin verantwortlich ist. Weitere Experimente führten zu dem Stilllegen der HCSQTs in *Nicotiana benthamiana* (AJ555865.1) und *Arabidopsis thaliana* (AT5G48930) und dadurch zu einer verringerten Expression und einer veränderten Ligninbildung. Das Herunterregulieren resultierte in einem Ansteigen der **H**- (p-Hydroxyphenyl) Einheiten, der Reduktion der **S**- (dimethoxylierte Syringyl) Einheiten und einem signifikanten Anstieg der Caffeoyle-Chinaterster in Stängeln, während die Blätter weniger stark betroffen waren (Hoffmann et al. 2004, 2005). Nur ein Jahr später isolierten Niggeweg et al. (2004) eine HQT aus Tomate (AJ582652.1) und Tabak (AJ582651.1). Die Überexpression des HQT-Gens in Tomaten führte zu einer 85%igen Steigerung der CA-Akkumulation in Blättern, ein Stilllegen des HQT-Gens führte zu einer starken Reduktion der CA-Akkumulation um 98%. Außerdem wurden drei mögliche Synthesewege postuliert (Abbildung 63): In Tomaten, Tabak und Kartoffeln katalysiert das Enzym HQT die Bildung von CA

aus Caffeoyl-CoA und Chinasäure (Route 1). In anderen Spezies z.B. in der Süßkartoffel dient ein Caffeoyl-Glucoseester als Zwischenprodukt (Villegas und Kojima 1986, Route 2). Ein dritter möglicher Weg beinhaltet die Synthese von p-Cumaroyl-Chinat durch eine Acyltransferase und anschließende Hydroxylierung zur CA durch eine p-Cumarat 3'-Hydroxylase (Route 3). Dieser Weg wurde zuerst von Kühnl et al. (1987) postuliert. Mahesh et al. (2007) zeigten, dass die CYP98A35 (Ehlting et al. 2006) aus *Coffea canephora* in der Lage ist, 4-Cumaroyl-Shikimat und 4-Cumaroylchinat mit der gleichen Effizienz umzusetzen. Lepelley et al. untersuchten (2007) die HQT-Expression (EF153931) in *Coffea canephora*, welche mit der Akkumulation von CA korrelierte.

Bis jetzt ist aber immer noch nicht ganz genau geklärt, welcher exakte Mechanismus für die Biosynthese der CA verantwortlich ist (Kim et al. 2013). Möglicherweise existieren die postulierten Biosynthesewege nebeneinander und die Bildung der CA ist nicht auf einen einzigen Weg zurückzuführen.

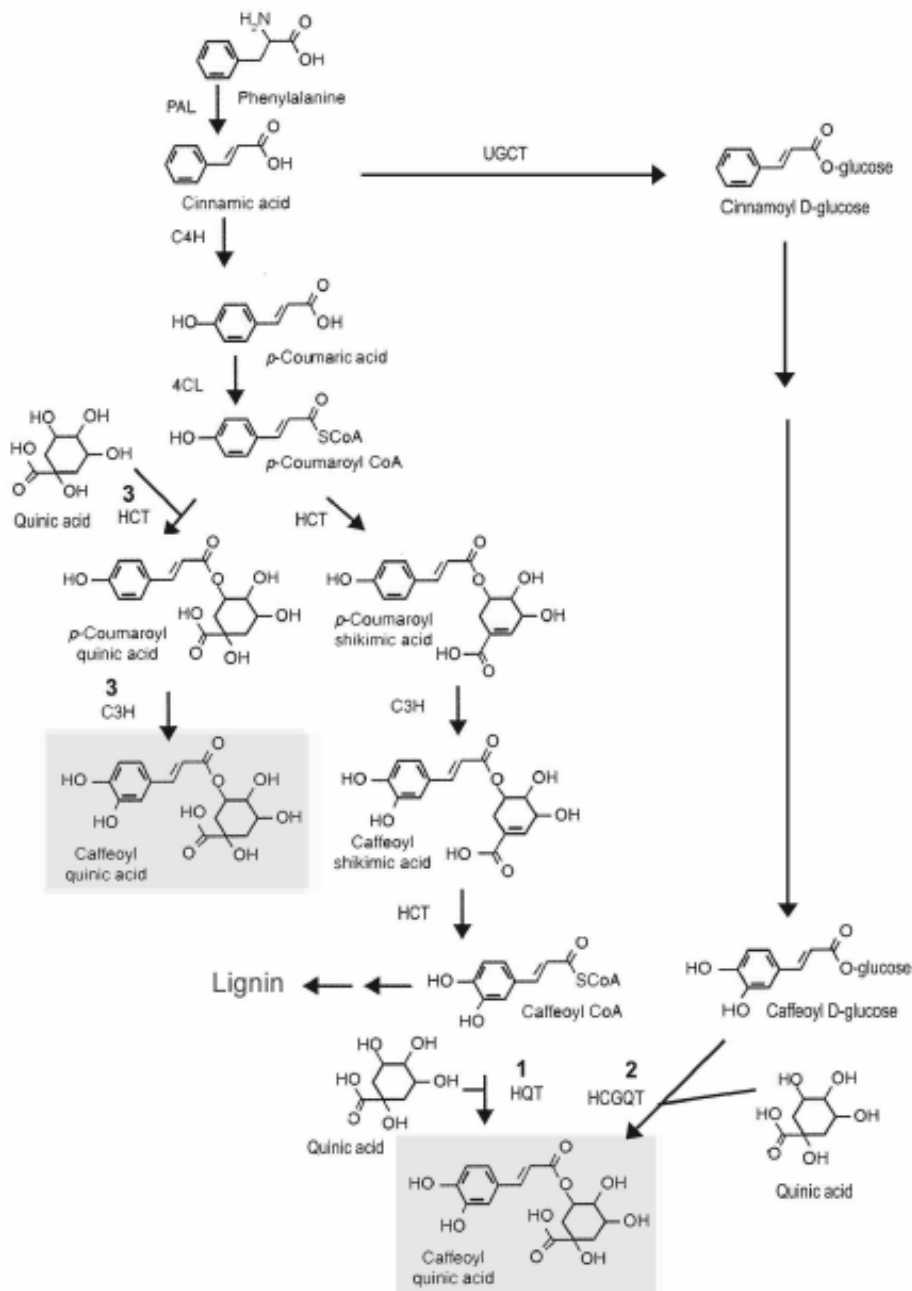


Abbildung 63: Postulierte Wege der Chlorogensäurebiosynthese in Pflanzen. Die drei verschiedenen Routen sind mit 1, 2 und 3 gekennzeichnet. PAL: Phenylalanin Ammoniak-Lyase, C4H: Zimtsäure 4-Hydroxylase, 4CL: 4-Hydroxyzimtsäure CoA-Ligase, C3H: p-Cumarat 3'-Hydroxylase, HQT: Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinat Hydroxycinnamoyltransferase, HCT: Hydroxycinnamoyl-CoA: Shikimat/Chinat Hydroxycinnamoyltransferase, UGCT: Zimtsäure Glykosyltransferase, HCGQT: Hydroxycinnamoyl-D-Glucose:Chinat Hydroxycinnamoyltransferase aus Niggeweg et al. 2004

Wagner et al. (2007) legten eine HST in tracheenartigen Strukturen in *Pinus radiata*-Zellkulturen still und entdeckten eine starke Reduktion des Ligningehalts, Veränderungen der Monolignolzusammensetzung und vor allem eine starke Tendenz zur Bildung des H-Typs der Monolignole, während die **G**-(Guajacyl) Einheiten reduziert wurden. Comino et al. konnten im gleichen Jahr eine HCSQT (DQ104740) aus *Cynara cardunculus* isolieren,

welche eine starke Präferenz für Chinat als Substrat aufweist. Zwei Jahre später isolierte die gleiche Gruppe zwei HQT-Gene (DQ915589.1; DQ915590.1) aus der Artischocke. Außerdem konnte mittels Real-time PCR ein Anstieg der HQT-Transkriptmenge in Blättern, welche UV-C-Strahlung ausgesetzt waren, bewiesen werden. Sonnante et al. (2010) konnten erste dreidimensionale Modelle von zwei HCSQTs (AM690438, EU839580) mit der Präferenz für Chinat aus Artischocke publizieren. Es konnten zwei benachbarte Bindetaschen, welche mit dem aromatischen Rest von Caffeoyle-Chinat oder p-Cumaroyl-Chinat reagieren könnten, in den Binderegionen der beiden HQTs festgestellt werden. Die Bindetasche der HCT, welche bevorzugt Shikimat bindet, unterscheidet sich in einigen AS-Resten. Die beiden HQTs differieren möglicherweise in der Substratazeptanz: HQT 1 scheint CA direkt aus Chinat und Caffeoyle-CoA zu bilden. HQT 2 ist wahrscheinlich an der Bildung von p-Cumaroylchinat beteiligt. Lallemand et al. (2012 a,b) beschrieben eine Kristallstruktur einer HCSQT aus *Coffea canephora* (EF137954.1). Die dreidimensionalen Strukturen einer nativen HCT und einer Proteolyse-unanfälligeren Lysin-Mutante konnten der Aufklärung von bestimmten Resten, welche für die Substratspezifität und zur Katalyse wichtig sind, dienen. Die Tertiärstruktur der HCT wird durch zwei fast gleich große Chloramphenicol-Acyltransferase-Domänen bestimmt, welche eine große β -Faltblattstruktur, flankiert durch α -Helices, aufweisen und durch eine überkreuzte Schlinge miteinander verbunden sind. Das Vorkommen der zwei Domänen ist für BAHD-Acyltransferasen typisch (Ma et al. 2005). 2013 wurden von Walker et al. die Kristallstrukturen der Apoformen und des Ternärkomplexes einer HCSQT aus *Sorghum bicolor* vorgestellt. Es handelt sich auch hier um zwei Domänen, welche insgesamt aus 16 β -Faltblattstrukturen und 17 α -Helices bestehen. Durch Differenzdichtekarten konnten die Positionen von Shikimat und pC-CoA visualisiert werden. Die verschiedenen Dichten zeigen, dass die Moleküle miteinander reagieren und als freies HS-CoA und p-Cumaroyl-Shikimat vorliegen. In der Apo-Struktur des Proteins war der Bereich, der zu der Bindetasche gehörte, Teil eines Tunnels, der sich durch das gesamte Protein zog. Das katalytische His-162 ist in der Mitte des Tunnels lokalisiert und kann von beiden Seiten erreicht werden. Höchstwahrscheinlich gelangen die beiden Substrate von gegenüberliegenden Eingängen in den Tunnel. Der phenolische Rest des p-Cumaroyl-Shikimats wird indirekt zu den beiden OH-Gruppen der Seitenketten von Ser-38 und Tyr-40 dirigiert. Die 1-OH-Gruppe eines potentiellen Chinatrests würde einen sterischen Zusammenstoß mit Pro-32 verursachen und würde durch die van-der-Waals-Kräfte der Oberfläche hinausbefördert.

Leider schlugen alle Versuche fehl, Proteinkristalle des RAS-Proteins aus *Coleus blumei* zu erhalten. In Zukunft müssen auf jeden Fall die erfolgreichen Kristallisationsbedingungen von Lallemand et al. (2012 a,b) und Walker et al. (2013) getestet werden. Ob eine Abspaltung des His-tags zu einem Erfolg geführt hätte, bleibt fraglich, da bei der Kristallisation einer HCSQT aus der Mohrenhirse (Walker et al. 2013) keine Abspaltung erfolgt war. Eine weitere Möglichkeit wäre das hanging-drop-Verfahren und die optionale Lagerung bei -80 °C. Auf jeden Fall können die Expression in den SoluBL21TM-Zellen und die Aufreinigung über Gel-permeationschromatographie als Grundlagen für die Untersuchung weiterer Kristallisationsbedingungen dienen.

3.2 Projekt 2: Untersuchungen von chimären HST/RAS- und RAS/HST-Proteinen

3.2.1 Ergebnisse der Aktivitätstests von chimären HST/RAS- und RAS/HST-Proteinen

Sander (2010) verglich die Sequenzen der Vinorinsynthase aus *Rauvolfia serpentina*, die z.B. an der Biosynthese des Indolalkaloids Ajmalin beteiligt ist (Ma et al. 2005), mit den CbRAS- und CbHST-Sequenzen. Im Bereich der Schlaufe, die Domäne I und II verbindet, waren deutliche Sequenzunterschiede erkennbar. Um Ähnlichkeiten in den Sekundär- und Tertiärstrukturen der drei BAHD-Acyltransferasen zu bestimmen, wurden von Sander (2010) HST-RAS- und RAS-HST-Chimären hergestellt. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die CbRAS und die CbHST auch aus zwei ungefähr gleich großen Domänen bestehen, die durch eine Schlinge miteinander verbunden sind. Die Plasmide pET-15b-CbRAS und pET-15b-CbHST wiesen eine gemeinsame Schnittstelle in der möglichen Schlaufe auf. Durch den Verdau mit CviQI und eine kreuzweise Ligation der N- und C-terminalen Fragmente konnten die beiden Domänen vertauscht werden (siehe Abbildung 64).

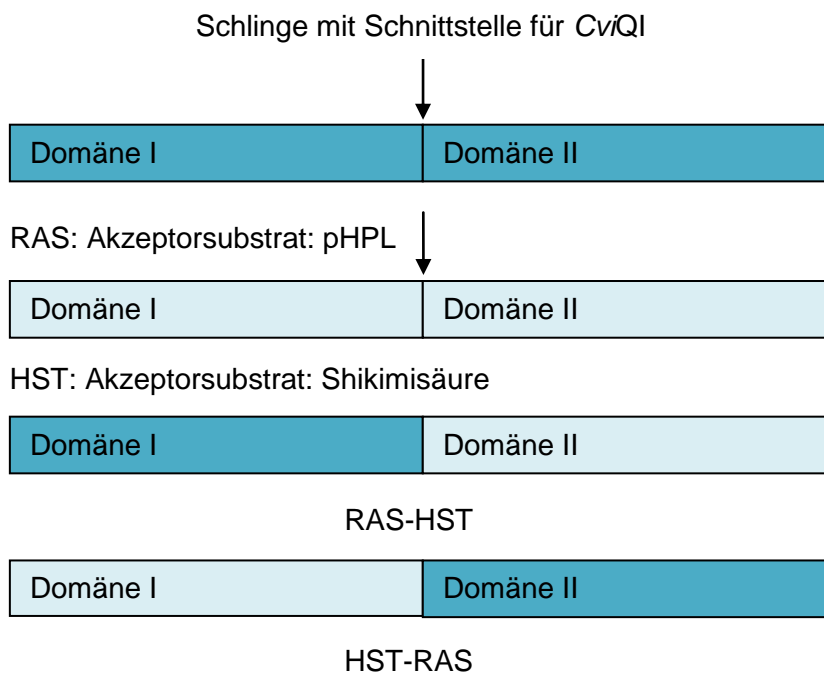


Abbildung 64: Schematische Darstellung der RAS-HST- und HST-RAS-Chimären

Nach der heterologen Expression und dem Aufschluss der Bakterienpellets (siehe Kapitel 2.2) wurden in den Enzymtests (siehe Kapitel 2.1.14; 2.2) direkt 100,5 µl Rohextrakt (ohne His-tag-Aufreinigung) in 24 h-Enzymtests eingesetzt, da bei Sander (2010) nach der His-tag-Aufreinigung in den RAS-/HST-Standardenzymtests (Einsatz von 50 µl Rohextrakt) keine Aktivität bestimmt werden konnte. Um detailliertere Aussagen treffen zu können, wurden im Anschluss 4 h-Enzymtests durchgeführt. Es existierten jeweils vier parallele Expressions-

ansätze von HST-RAS und RAS-HST, die von unterschiedlichen Klonen von ein- und derselben Platte, also einem Transformationsansatz, stammten (Sander 2010).

3.2.1.1 Aktivitätstests der HST-RAS-Chimären

3.2.1.1.1 24 h-Test der HST-RAS-Chimären

Es wurden zuerst RAS-Enzymtests (siehe Kapitel 2.1.14) von den HST-RAS-Chimären 1-4 mit Reaktionszeiten von 0 bis 24 h durchgeführt, um die maximale Produktmenge pro Testansatz bestimmen zu können (siehe Abbildung 65).

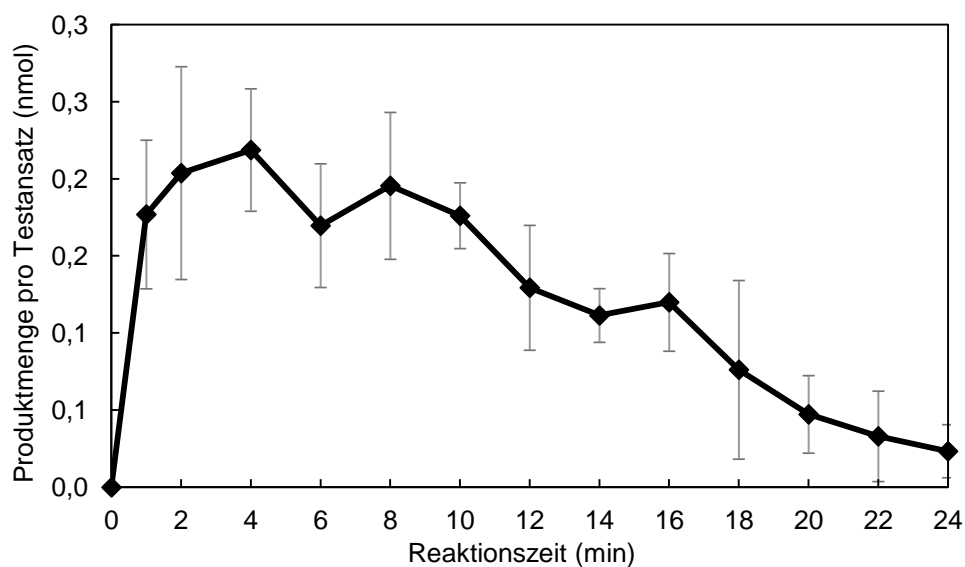


Abbildung 65: RAS-Aktivitätstests von HST-RAS-Chimären 1-4 aus *E. coli* BL21(DE3)pLysS mit pET 15b-CbHST-RAS, Akzeptorsubstrat: pHPL, 0-24 h Inkubationszeit. Jeder Wert ist ein Mittelwert der vier Chimären mit der entsprechenden Standardabweichung.

Die maximale Produktmenge (0,22 nmol) pro Testansatz wurde bei den HST-RAS-Chimären mit pHPL als Akzeptorsubstrat nach vier Stunden erreicht (siehe Abbildung 65).

Bei den 24 h-Standardenzymtests mit Shikimisäure als Akzeptorsubstrat (siehe Kapitel 2.2) konnte keine Enzymaktivität gemessen werden.

3.2.1.1.2 4 h-Test der HST-RAS-Chimären

Um detailliertere Erkenntnisse zu erhalten, wurde eine 4 h-Zeitreihe durchgeführt (siehe Abbildung 66).

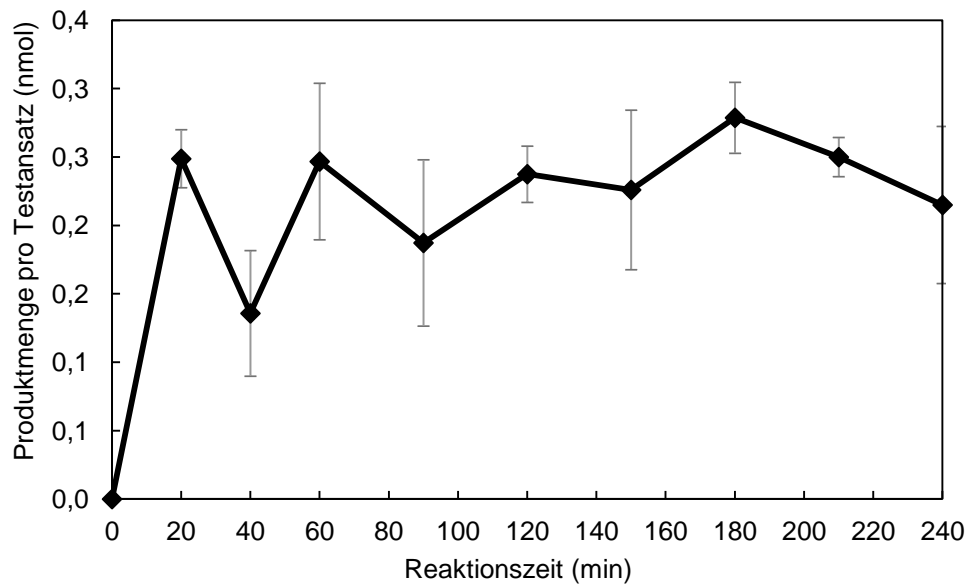


Abbildung 66: RAS-Aktivitätstests von HST-RAS-Chimären 1-4 aus *E. coli* BL21(DE3)pLysS mit pET 15b-CbHST-RAS, Akzeptorsubstrat: pHPL, 0-4 h Inkubationszeit. Jeder Wert ist ein Mittelwert der vier Chimären mit der entsprechenden Standardabweichung.

Die maximale Produktmenge von 0,28 nmol pro Testansatz konnte bei den HST-RAS-Chimären, bei Verwendung von pHPL als Akzeptorsubstrat nach 180 min bestimmt werden.

Bei den 4 h-Standardenzymtests mit Shikimisäure als Akzeptorsubstrat (siehe Kapitel 2.2), konnte wiederum keine Enzymaktivität bestimmt werden.

3.2.1.2 Aktivitätstests der RAS-HST-Chimären

3.2.1.2.1 24 h-Test der RAS-HST-Chimären

Mithilfe einer Zeitreihe von 0 bis 24 h wurden auch von den RAS-HST-Chimären 1-4 Enzymtests durchgeführt, um die maximale Produktmenge pro Testansatz bestimmen zu können (siehe Abbildung 67).

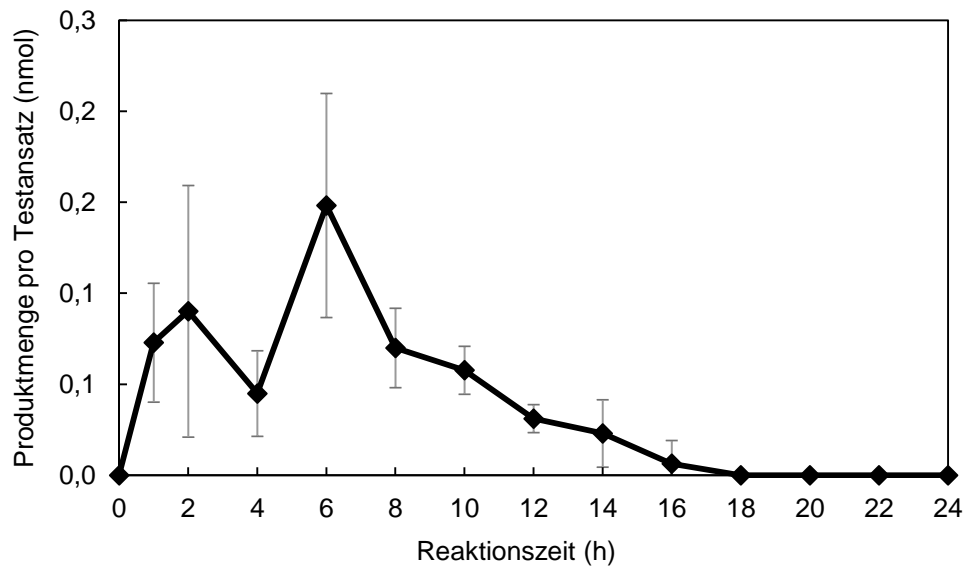


Abbildung 67: RAS-Aktivitätstests von RAS-HST-Chimären 1-4 aus *E. coli* BL21(DE3)pLysS mit pET 15b-CbHST-RAS, Akzeptorsubstrat: pHPL, 0-24 h Inkubationszeit. Jeder Wert ist ein Mittelwert der vier Chimären mit der entsprechenden Standardabweichung.

Die maximale Produktmenge (0,15 nmol) pro Testansatz wurde bei den RAS-HST-Chimären mit pHPL als Akzeptorsubstrat nach sechs Stunden erreicht (siehe Abbildung 67).

Bei den 24 h-Standardenzymtests mit Shikimisäure als Akzeptorsubstrat (siehe Kapitel 2.2), konnte auch bei den RAS-HST-Chimären keine Enzymaktivität bestimmt werden.

3.2.1.2.2 4 h-Test der RAS-HST-Chimären

Um die 24 h-Messungen zu verifizieren, wurden auch bei den RAS-HST-Chimären 4 h-Tests durchgeführt (siehe Abbildung 68).

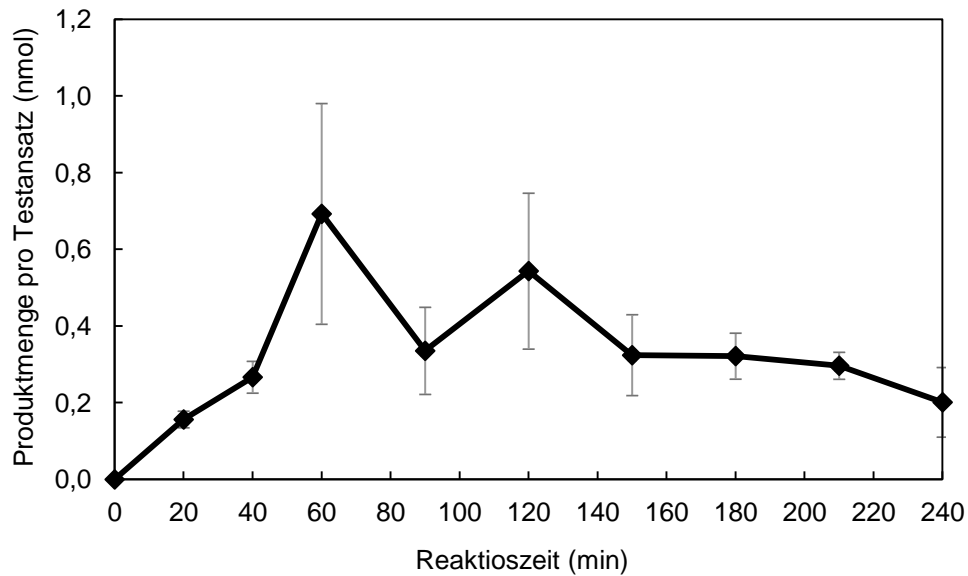


Abbildung 68: RAS-Aktivitätstests von RAS-HST-Chimären 1-4 aus *E. coli* BL21(DE3)pLysS mit pET 15b-CbHST-RAS, Akzeptorsubstrat: pHPL, 4 h Inkubationszeit. Jeder Wert ist ein Mittelwert der vier Chimären mit der entsprechenden Standardabweichung.

Die maximale Produktmenge von 0,7 nmol konnte nach 60 min bestimmt werden (siehe Abbildung 68).

Auch bei den 4 h-Standardenzymtests der RAS-HST-Chimären mit Shikimisäure als Akzeptorsubstrat (siehe Kapitel 2.2) konnte keine HST-Aktivität bestimmt werden.

Zusammenfassend konnten sowohl bei den RAS-HST als auch bei den HST-RAS-Mutanten äußerst geringe Produktmengen im Vergleich zu den Wildtypen beobachtet werden.

3.2.2 Diskussion der Aktivitätstests mit chimären HST/RAS- und RAS-HST-Proteinen

Sander (2010) führte einen Sequenzvergleich der Vinorinsynthase (VS) aus *Rauvolfia serpentina* (Ma et al. 2005) mit der CbRAS und der CbHST durch und detektierte ähnliche AS in den Sekundärstrukturbereichen, aber deutliche Unterschiede im Bereich der Schleife, welche die Domänen I und II miteinander verbindet. Es wurden CbRAS/HST- und CbHST/RAS-Chimären erstellt, um herauszufinden, in welcher der Domänen bei gleichem Donor-substrat die Spezifität für das Akzeptorsubstrat lokalisiert ist. Da angenommen wurde, dass die beiden HCTs wie die VS aus zwei gleich großen Domänen aufgebaut sind, die durch eine Schlinge miteinander verbunden sind, wurden Chimären hergestellt, bei denen jeweils eine Domäne vertauscht wurde. Die Plasmide pET-15b-CbRAS und pET-15b-CbHST der aktiven Klone wiesen eine gemeinsame Restriktionsschnittstelle in der putativen Schlinge auf und waren somit für die Konstruktion der Chimären geeignet. Der Verdau beider VL-Sequenzen mit dem Restriktionsenzym CviQI ergab zwei etwa gleich große DNA-Fragmente. Durch eine kreuzweise Ligation N- und C-terminaler Fragmente entstanden die Chimären CbRAS/HST und CbHST/RAS. Der Übergang vom Original- zum Fremdprotein befand sich innerhalb der putativen Schleife von CbRAS und CbHST (siehe Abbildung 69).

| | |
|----------------|--|
| CbRAS | MKIEV-----Sacl-----HxxxD-----CviQI-----Sacl-----DFGWG-----FYEI |
| CbHST | MKIHV-----Sacl-----HxxxD-----CviQI-----Sacl-----DFGWG-----LYQI |
| HST/RAS | MKIHV-----Sacl-----HxxxD-----CviQI-----Sacl-----DFGWG-----FYEI |
| RAS/HST | MKIEV-----Sacl-----HxxxD-----CviQI-----Sacl-----DFGWG-----LYQI |

Abbildung 69: Schematische Darstellung der Aminosäuresequenzen von CbRAS (rosa) und CbHST (blau) mit den HST/RAS- und den RAS/HST-Chimären. Die Restriktionsschnittstellen CviQI und SacI sowie die konservierten Motive HxxxD und DFGWG sind gekennzeichnet. Das Restriktionsenzym CviQI schneidet genau in der Mitte der Sequenzen, in der putativen Schleife zwischen den Domänen I und II, geänderte Abbildung aus Sander 2010

Da Sander (2010) in ihren Experimenten keinerlei katalytische Aktivität der Chimären detektieren konnte, wurden hier in Enzymtests größtmögliche Volumina des Proteinrohextrakts (100,5 µl) eingesetzt. Das Austauschen der beiden Domänen mithilfe von CviQI führte zu einem fast vollständigen Aktivitätsverlust der designten Chimären.

Eine geringfügige Produktbildung konnte bei den RAS/HST- und HST/RAS-Chimären nur bei Verwendung von pHPL als Akzeptorsubstrat festgestellt werden. Außerdem lag die Beobachtung zugrunde, dass die gebildete Produktmenge nach sechs (RAS-HST) bis acht Stunden (HST-RAS) in den 24 h-Enzymtests wieder abnahm (siehe Abbildungen 65 und 67), während sie in den 4 h-Enzymtests mehr oder weniger stagnierte (siehe Abbildungen 66 und 68). Hier müssen noch Kontrolltests mit RA durchgeführt werden, ob eine starke Esterase-

aktivität zu beobachten ist. Bei der Verwendung des Akzeptorsubstrats Shikimisäure wurde keinerlei Produktbildung festgestellt.

Dieses Phänomen ist zunächst kurios, da die vollständigen Domänen ausgetauscht wurden und an der Allgemeinstruktur des Proteins nichts verändert wurde. Bei näherer Betrachtung fielen jedoch die unterschiedlichen K_m -Werte und Ausgangsaktivitäten der beiden Wildtyp-proteine CbRAS und CbHST auf. Die CbRAS hatte bei Verwendung von Caffeoyl-CoA als Donorsubstrat einen K_m -Wert von 163 μM für pHPL und eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von 176,5 mkat/kg mit His-tag und wies einen K_m -Wert von 219 μM und eine Maximalgeschwindigkeit von 102 mkat/kg ohne His-tag auf. Die K_m -Werte und maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten für das Akzeptorsubstrat (pHPL) lagen bei 2,1 μM und 41 mkat/kg für die CbRAS mit His-tag und bei 3,4 μM und 195 mkat/kg für die CbRAS ohne His-tag.

Bei der über His-tag-Affinitätschromatographie aufgereinigten CbHST konnte bei Verwendung von Caf-CoA als Donorsubstrat ein K_m -Wert von 6495 μM und eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von 1890 mkat/kg gemessen werden. Der K_m -Wert und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit für das Akzeptorsubstrat (Shikimisäure) wurden bei 8,8 μM und bei 361 mkat/kg gemessen (Sander 2010).

Anhand dieser Daten kann die Behauptung aufgestellt werden, dass allgemein eine geringere Affinität von Caf-CoA zu der CbHST vorlag und sich somit HST-Aktivität unterhalb der Detektionsgrenze befand. Aus den Messungen von Sander (2010) ist ersichtlich, dass pC-CoA und Shikimat die bevorzugten Substrate der CbHST sind (K_m : 332 μM). Der K_m -Wert in Kombination mit Caf-CoA ist fast zwanzigmal höher. Die Konformationsänderung des Enzyms je nach Substratkombination wird als induced fit (induzierte Passform) bezeichnet (Koshland 1958). Deshalb müssten auf jeden Fall zukünftig die Messungen der Chimären mit pC-CoA als Akzeptorsubstrat getestet werden.

Es liegt die Vermutung nahe, dass sich die CoA-Bindetaschen von CbRAS und CbHST ähneln, sich die Akzeptorbindetaschen jedoch stark unterscheiden (Sander 2010). Diese Annahmen korrelieren auch mit den Aussagen aus Petersen et al. (2009): die OH-Gruppe bei pHPL befindet sich in der flexiblen Seitenkette, die OH-Gruppen von Shikimat und Chinat sind an geschlossenen Ringen befestigt. Auch die Abstände zwischen den Carboxylgruppen der Akzeptoren und den zu veresternden OH-Gruppen unterscheiden sich bei den drei BAHD-Acyltransferasen (siehe Abbildung 70).

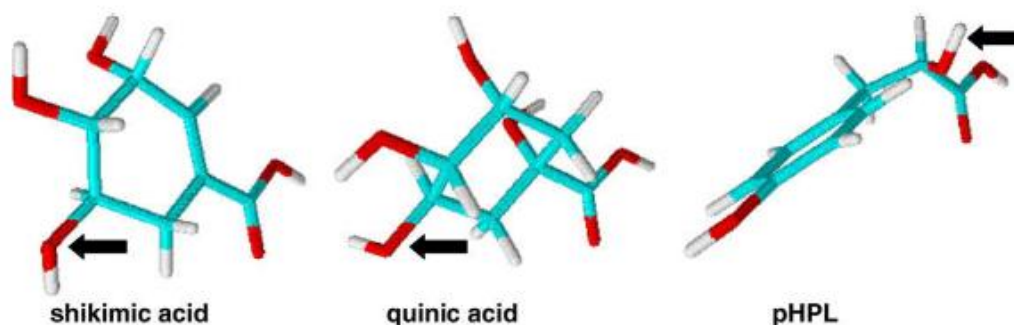


Abbildung 70: 3D-Strukturen der Akzeptorsubstrate von Hydroxycinnamoyltransferasen. Die OH-Gruppe, welche den 4-Cumarsäure-Rest akzeptiert, wurde durch einen Pfeil gekennzeichnet aus Petersen et al. 2009

Lallemand et al. (2012b) stellten die Hypothese auf, dass die C5-OH-Gruppe des Chinat- oder Shikimatrests einer HCSQT aus *Coffea canephora* mit dem katalytischen His-153 reagiert. In der Nähe des katalytischen His-153 konnten drei putative Substratbindetaschen (SBP, substrate binding pockets) identifiziert werden. Die Shikimat- und Chinat-Reste binden vermutlich an SBP1. Diese Tasche ist vorwiegend hydrophob, dennoch befinden sich darin polare Reste (His-153, Thr-36, Arg-357, Thr-370 und die weiter entfernten Thr-305 und Tyr-397), welche mit dem Substrat Wasserstoffbrückenbindungen eingehen können. Die Arg-357-Seitenkette kann potentiell mit der Carboxygruppe von Shikimat oder Chinat interagieren. Der Hydroxyzimtsäurerest dockt einheitlich an die benachbarte Bindetasche SBP2. Eine mögliche 3,5-Dicaffeoylchinasäure bindet mit dem Hydroxyzimtsäurerest an C3 an SBP2 und mit dem Hydroxyzimtsäurerest an C5 an SBP3, welche sich nahe der Oberfläche des Proteins befindet.

Die SBP1-Acylzeptor-Bindungsstelle enthält die für die Bindung wichtigen Reste in der flexiblen $\alpha 1$ - $\beta 3$ -Schleufe, welche nicht nur an der Bindung des Hydroxyzimtsäurerests, sondern auch an der Bindung des Acylakzeptors beteiligt ist. Der größte strukturelle Unterschied zwischen China- und Shikimisäure ist das Vorhandensein einer OH-Gruppe an C1 bei der Chinasäure und einer Doppelbindung zwischen C1 und C2 bei der Shikimisäure, welche in einer unterschiedlichen Geometrie des Polyolringes resultiert. In den verschiedenen HCTs befinden sich die hochkonservierten Reste Leu-400 und Phe-402 in der Nachbarschaft der C1-Position des Akzeptormoleküls. Die hydrophobe Natur dieser Reste mag die Bindung der Shikimisäure über van-der-Waals-Kräfte in der Region der Doppelbindung begünstigen. In allen HQTs ist der Leucinrest durch Threonin und der Phenylalaninrest durch Tyrosin ersetzt. Diese Änderungen bewirken Wasserstoffbrückenbindungen mit der Hydroxylgruppe an C1 und favorisieren die Bindung der Chinasäure (Lallemand et al. 2012b). In der SBP2 (Hydroxyzimtsäurebindetasche) können verschiedene Reste, die sich in unterschiedlichen Teilen der Substratbindetasche befinden, das benötigte Volumen so verändern, dass verschiedene Substrate selektiert werden können. Zusätzlich kann die Schleufe zwischen Val-31 zu Pro-37, welche sich ebenfalls in der SBP2 befindet, verschiedene Konformationen einnehmen und so die Größe der Bindetasche variieren, so dass auch methoxylierte Zimtsäure-

derivate gebunden werden können. Der HCSQT-Wildtyp aus *Coffea canephora* hatte eine höhere Affinität zu Shikimat (K_m : 75 μ M) als zu Chinat (K_m : 430 μ M). Außerdem konnte er, nach einer ÜN-Inkubation mit 1 mM 5-CA und 1 mM CoA, DicaFFEoylchinasäure produzieren.

Die von Walker et al. (2013) publizierte Kristallstruktur einer HCSQT aus *Sorghum bicolor* weist diverse Ähnlichkeiten auf (siehe Kapitel 3.1.2.2).

Möglicherweise sind die Substratbindetaschen bei den Chimären so stark verändert, dass die Bindung nur sehr eingeschränkt möglich ist. Genauere Untersuchungen stehen noch aus, und es muss sich zeigen, inwieweit die Strukturen der CbRAS und der CbHST mit den Kristallstrukturen aus der Mohrenhirse (Walker et al. 2013) und der HCSQT aus *Coffea canephora* (Lallemand et al. 2012 a,b) übereinstimmen.

3.3 Projekt 3: Charakterisierung einer Suspensionskultur von *Glechoma hederacea*

3.3.1 Ergebnisse der Charakterisierung einer Suspensionskultur von *Glechoma hederacea*

3.3.1.1 Bestimmung von Wachstumsparametern

Das Ziel dieses Projekts war die Bestimmung der Gehalte an Chlorogen-, Kaffee- und Rosmarinsäure in einer Suspensionskultur von *Glechoma hederacea*. Zu diesem Zweck wurde aus einer Kalluskultur (siehe Kapitel 2.4.1) eine Suspensionskultur herangezogen (siehe Kapitel 2.4.2) und diese über einen Zeitraum von zwei Wochen hinsichtlich der Wachstums- und Mediumsparameter, der spezifischen PAL- und RAS-Aktivitäten und des Protein-, CA-RA- und Kaffeesäuregehalts untersucht. Es wurde ein CB-Medium (Petersen und Alfermann 1988) mit 2% Saccharose (CB2-Medium, siehe Kapitel 7.3.4) verwendet.

Am Tag 0 der Charakterisierungsperiode wurden in der Sterilbank von einer 7 Tage alten Suspensionskultur exakt 5 g Zellnassgewicht in einen Kolben mit flüssigem CB2-Medium überführt. Insgesamt wurden 72 Kolben angeimpft. Die Kolben, die an diesem Tag analysiert werden sollten, wurden als Letztes mit Zellen bestückt. Pro Probe wurden ein bis drei Kolben geerntet (siehe Kapitel 2.4.3). Pro Tag wurden jeweils drei separate Ernten durchgeführt und die Mittelwerte der untersuchten Parameter bestimmt.

Das Frischgewicht der abgenutzten Zellen (siehe Kapitel 2.4.4) stieg konstant von 2,5 g an Tag 0 bis zu 10,9 g pro Kolben an Tag 7 an (siehe Abbildung 71).

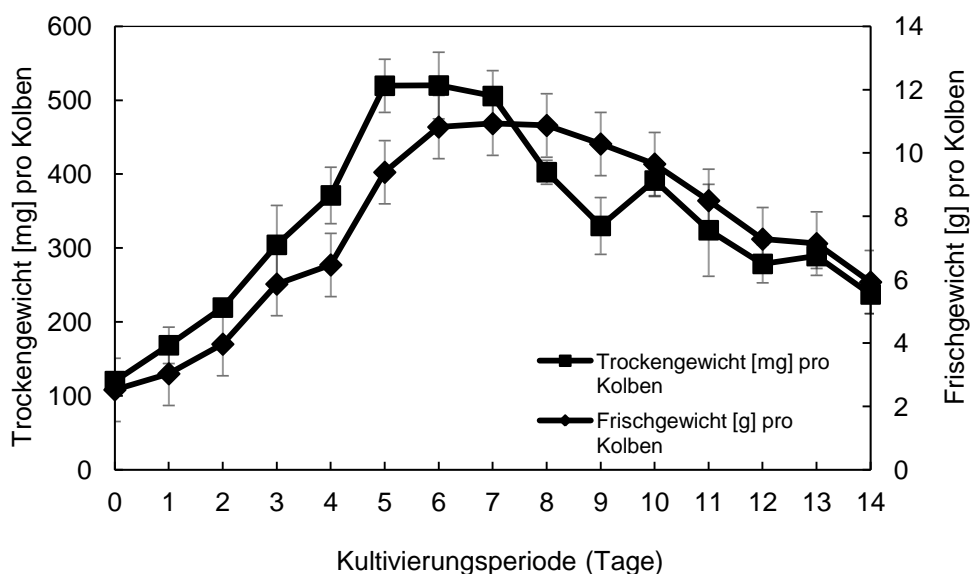


Abbildung 71: Zeitverlauf des Frisch- und Trockengewichts in einer Suspensionskultur von *Glechoma hederacea* in CB2-Medium. Jeder Wert ist der Mittelwert aus drei individuellen Erntevorgängen.

Auch das Trockengewicht (siehe Abbildung 2.4.4) stieg kontinuierlich an, bis es einen maximalen Wert von 520 mg/Kolben an Tag 6 der Kultivierungsperiode erreichte (siehe Abbildung 71). Nach dem Überschreiten der maximalen Menge sanken sowohl das Frisch- als auch das Trockengewicht durch den progressiven Zelltod stetig ab.

3.3.1.2 Bestimmung von Mediumsparametern

Der pH-Wert des zellfreien Mediums (siehe Kapitel 2.4.6) sank kurzfristig ab, stieg dann bis zum Tag 11 an und nahm ab diesem Zeitpunkt wieder ab (siehe Abbildung 72). Die elektrische Leitfähigkeit nahm bis zum Tag 6 auf einen Wert von 0,58 mS ab und stieg dann bis zum Ende der Kulturcharakterisierung kontinuierlich an (1,25 mS). Der Zuckergehalt, der durch den Brechungsindex bestimmt wurde, nahm stark ab (Tag 0: 2,5%) und zeigte an Tag 4 einen starken Sprung von 1,8 auf 0,5%. Von diesem Zeitpunkt wies er ein konstant niedriges Level bis zum Ende der Charakterisierung auf.

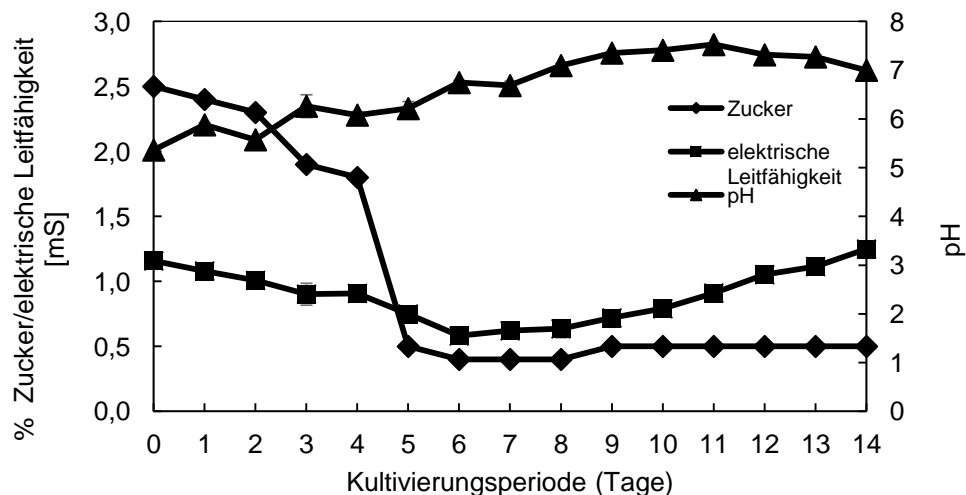


Abbildung 72: Zeitverlauf des Zuckergehalts, der elektrischen Leitfähigkeit und des pH-Werts in einer Suspensionskultur von *Glechoma hederacea* in CB2-Medium. Jeder Wert ist der Mittelwert aus drei individuellen Erntevorgängen.

3.3.1.3 Bestimmung des Chlorogensäure-, Kaffeesäure- und Rosmarinsäuregehalts

Die lyophilisierten Zellen wurden mit 70%igem EtOH mittels Ultraschall extrahiert, und der Gehalt an Kaffeesäure, CA und RA wurde per HPLC bestimmt (siehe Kapitel 2.3.7; siehe Abbildung 73). Der höchste Gehalt an CA wurde an Tag 1 mit 0,4% des Zelltrockengewichts bestimmt. Danach blieb er konstant auf einem niedrigen Niveau, welches zum Ende der Periode fast auf Null absank.

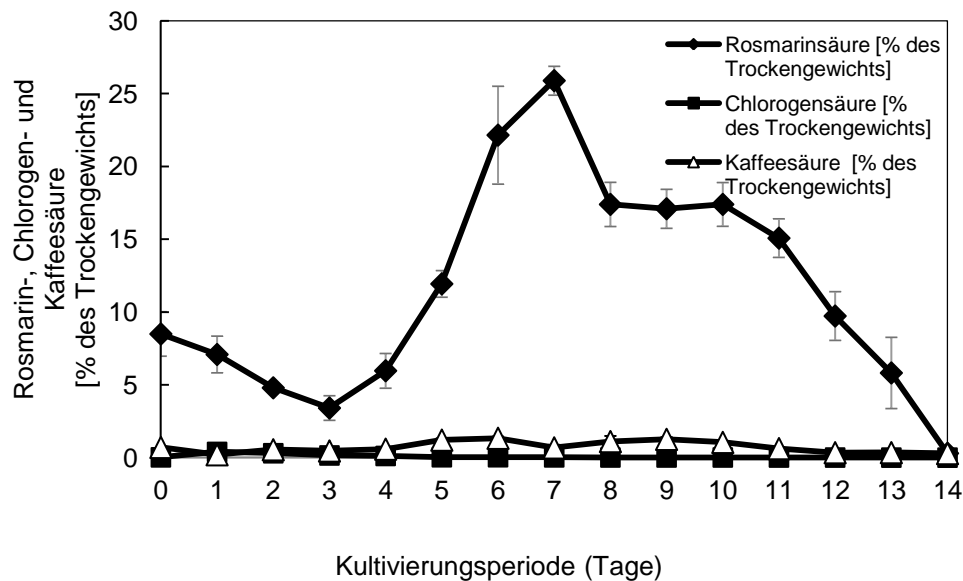


Abbildung 73: Zeitverlauf des Rosmarinsäure-, Chlorogensäure- und Kaffeesäuregehalts in einer Suspensionskultur von *Glechoma hederacea* in CB2-Medium. Jeder Wert ist der Mittelwert aus drei individuellen Erntevorgängen.

Der Kaffeesäuregehalt stieg von 0,6% des Trockengewichts an Tag 4 bis zu 1,33% an Tag 6 an und sank dann ab Tag 9 wieder ab. Beim Vergleich der Kaffeesäureester konnte der höchste Gehalt definitiv durch die RA erzielt werden, welche an Tag 7 einen Gehalt von fast 26% des Trockengewichts aufwies. Der RA-Gehalt sank zunächst in den ersten Tagen auf 4,1% und stieg dann kontinuierlich an. Nach dem Maximum an Tag 7 konnte ein stetiges Absinken beobachtet werden (siehe Abbildung 73).

3.3.1.4 Bestimmung der Enzymaktivitäten von PAL und RAS

Nach dem Herstellen des Proteinrohextrakts (siehe Kapitel 2.4.5) und der Bestimmung des Proteingehaltes (siehe Kapitel 2.4.7) wurden die PAL- und RAS-Aktivitäten bestimmt (siehe Kapitel 2.4.8). Die spezifische Aktivität von PAL (siehe Abbildung 74) sank langsam bis Tag 2 und stieg dann rapide bis zum Tag 5, an dem sie ein Maximum von 49,4 $\mu\text{kat/kg}$ erreichte. Nach dem Peak sank die PAL-Aktivität wieder langsam bis zum Ende der Kultivierungsperiode. Auch bei der Untersuchung der Melissenkultur von Weitzel und Petersen (2009) in CB2-Medium wurde das PAL-Maximum an Tag 5 bestimmt. In dieser Analyse korrelierte das mRNA-Level übereinstimmend mit der katalytischen Aktivität von PAL und RAS, weshalb bei der Untersuchung der Suspensionskultur von *Glechoma* auf die Bestimmung der Expressionslevel verzichtet wurde.

Die spezifische RAS-Aktivität (siehe Abbildung 74) sank von Tag 0 zu Tag 1 von 183,8 $\mu\text{kat/kg}$ auf 74,7 $\mu\text{kat/kg}$ und stieg bis zum Tag 8 (227,1 $\mu\text{kat/kg}$) wieder an, um dann bis zum Ende der Untersuchungsperiode auf einen Wert von 3,3 $\mu\text{kat/kg}$ an Tag 14 zu sinken. Auch hier wurden ähnliche Werte bei der Untersuchung der Melissen- und der *Coleus*-Kultur ermittelt (Petersen 1991; Weitzel und Petersen 2011).

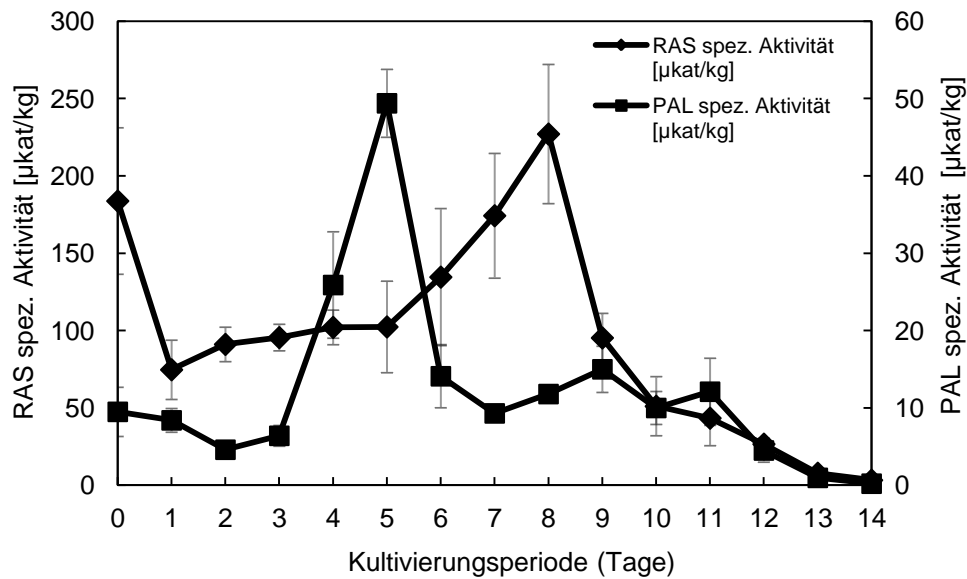


Abbildung 74: Zeitverlauf der spezifischen PAL- und RAS-Aktivität in einer Suspensionskultur von *Glechoma hederacea* in CB2-Medium. Jeder Wert ist der Mittelwert aus drei individuellen Erntevorgängen.

3.3.1.5 Vergleich von Dunkel- und Lichtkulturen

Verschiedene Autoren berichten über einen Anstieg des Chlorogensäure-Gehalts nach Lichtexposition (Baumann und Röhrig 1989; Gillet et al. 1999). Um dieses Phänomen zu untersuchen, wurde eine *Glechoma*-Lichtkultur an 0-14 Tagen (d) Dauerlicht ausgesetzt und der CA-Gehalt untersucht. Außerdem wurde RNA aus 7 d alten, gefriergetrockneten Dunkel- und Lichtkulturen isoliert (siehe Kapitel 2.3.1), in cDNA umgeschrieben (siehe Kapitel 2.3.3) und damit eine Standard-PCR (Einsatz von 1 µl cDNA) mit EF1α als Standard durchgeführt (siehe Kapitel 2.3.4.1), um die Expression von HST, der putativen HQT (siehe Kapitel 2.3.8.1), einer unbekannten HCT (Sander 2010) und RAS zu bestimmen.

Es konnte jedoch keine verstärkte CA-Akkumulation bei der Lichtkultur detektiert werden. Nach 7 d Inkubationszeit wies die Dunkelkultur einen CA-Gehalt von 0,06% und die Lichtkultur einen CA-Gehalt von 0,02% auf. Nach 14 Kulturtagen konnte ein CA-Gehalt von 1% sowohl in der Dunkelkultur als auch in der Lichtkultur gemessen werden.

Der RA-Gehalt lag bei der Dunkelkultur nach 7 d bei 19,3% und bei der Lichtkultur bei 9,4%. Nach einer Inkubationszeit von 14 d konnten bei der Dunkelkultur 0,2% und bei der Lichtkultur 3,1% gemessen werden.

Bei der Analyse der PCR-Produkte auf dem Agarosegel waren weder bei der unbekannten HCT noch bei der putativen HQT Banden erkennbar (siehe Abbildung 75). Da in den Dunkel- und Lichtkulturen auch kaum CA detektiert werden konnte, korrelierte dies mit der molekulargenetischen Beobachtung. Es waren gleich starke Banden bei dem Standard EF1 α erkennbar, ebenso bei der Untersuchung auf GhRAS und GhHST. Die GhHST-Banden waren deutlich stärker als die GhRAS-Banden ausgeprägt.

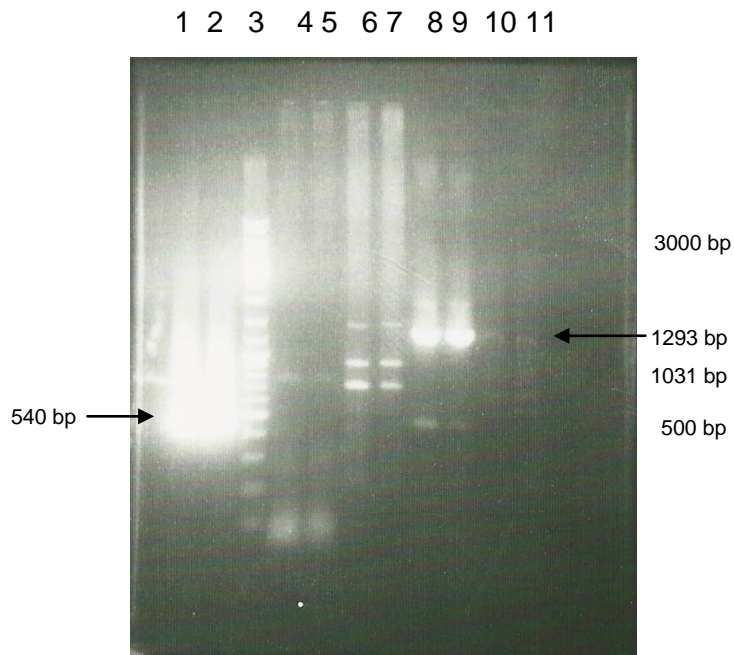


Abbildung 75: Agarosegel zur Untersuchung der Genexpression verschiedener Hydroxycinnymoyltransferasen in Dunkel- (D) und Lichtkulturen (L) von *Glechoma hederacea*: 1: EF1 α (D), 2: EF1 α (L), 3: GeneRuler™ DNA Ladder Mix, 4: unbekannte HCT (D), 5: unbekannte HCT (L), 6: putative HQT (D), 7: putative HQT (L), 8: HST (D), 9: HST (L), 10: RAS (D), 11: RAS (L)

3.3.2 Diskussion zur Charakterisierung einer Suspensionskultur von *Glechoma hederacea*

Zellkulturen werden in der Forschung häufig genutzt, da einige in der Lage sind, größere Mengen an Naturstoffen als die Wildpflanzen zu akkumulieren (Rout et al. 2000; Verpoorte et al. 2002; Karuppusamy 2009; Barberini et al. 2013). Vor allem konnte eine verstärkte RA-Produktion in undifferenzierten Zellkulturen gemessen werden (Petersen und Simmonds 2003).

Glechoma hederacea gehört zu einer Reihe von Pflanzen, die Chlorogensäure und Rosmarinsäure nebeneinander akkumulieren (Petersen et al. 2009). In dieser Kultur sollte der zeitliche Verlauf der Akkumulation von Kaffeesäure, CA und RA, neben den Wachstums- und Mediumsparametern, sowie den spezifischen Aktivitäten der Enzyme PAL und RAS gemessen werden.

3.3.2.1 Bestimmung der Wachstums- und Mediumsparameter

Bei der Bestimmung der Wachstumsparameter konnte ein Anstieg des Frisch- und Trockengewichts bis zum 7. bzw. 6. Kulturtag (siehe Kapitel 3.3.1.1; Abbildung 71) gemessen werden. Dies deckt sich mit der Beobachtung anderer Autoren (Weitzel und Petersen 2011; Nassar et al. 2013). Ab Tag 8 konnte eine Braunverfärbung der Zellen und des Mediums beobachtet werden, was auch für die Melissenkultur in CB2-Medium beschrieben wurde (Weitzel 2010). Die braune Farbe wird durch abgestorbene und lysierte Zellen verursacht. Durch diesen autokatalytischen Prozess werden Polyphenole gebildet und oxidiert, die zu einer weiteren Zellschädigung der Kultur führen können (Abohatem et al. 2011). Der Abfall im Trockengewicht korrelierte mit der Braunfärbung des Mediums und hängt wahrscheinlich mit dem Zelltod zusammen (Laukkanen et al. 2000).

Durch die Aufnahme des puffernden Phosphats aus dem Medium in die Zellen wird ein minimaler Abfall des pH-Werts verursacht. Der Anstieg des pH-Werts kann durch die verstärkte Abgabe von Ionen erklärt werden. Die elektrische Leitfähigkeit (siehe Kapitel 3.3.1.2; siehe Abbildung 72) nahm bis zum Tag 6 ab und stieg dann zum Ende der Kulturcharakterisierung kontinuierlich an bis sie ungefähr den Ausgangswert erreicht hatte. Das Abnehmen der elektrischen Leitfähigkeit kann durch die Aufnahme von Ionen durch die Zellen erklärt werden. Der Anstieg ist z.B. durch den langsamen Zelltod und ein Freiwerden intrazellulärer Bestandteile bedingt. Ein ähnliches Verhalten konnte bei der Kulturcharakterisierung von *Melissa officinalis* beobachtet werden (Weitzel 2009). Der Zuckergehalt, der durch den Brechungsindex bestimmt wurde, nahm stark ab und zeigte ab Tag 4 ein konstant niedriges Level bis zum Ende der Charakterisierung. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Weitzel (2010) in der Melissenkultur in CB2-Medium beobachtet.

3.3.2.2 Bestimmung des Chlorogensäure-, Kaffeesäure- und Rosmarinsäuregehalts

Die vorher gefriergetrockneten Zellen wurden mit 70%igem Ethanol extrahiert und ihr Gehalt an Kaffeesäure, CA und RA durch HPLC-Analyse bestimmt (siehe Kapitel 3.3.1.3; Abbildung 73). Der Chlorogensäuregehalt stieg am Tag 1 der Charakterisierung auf 0,4%, worauf er langsam auf einen konstant niedrigen Wert absank. Konczak-Islam et al. (2003) konnten ebenfalls einen zehnfachen Anstieg an CA nach zwei Tagen in Zellkulturen der Süßkartoffel feststellen. Möglicherweise handelt es sich um einen Schutzmechanismus der Zellkultur, wenn noch nicht genügend RA gebildet ist, da auch CA antibakterielle, antivirale und Radikalfänger-Eigenschaften aufweist (Chiang et al. 2002; Zhao et al. 2010).

Der Zeitverlauf des Kaffeesäuregehalts korrelierte eher mit dem der RA mit einem Maximum an Tag 6 von 1,33%. Es könnte sein, dass es sich hier um ein Abbauprodukt der RA handelt. RA war im Vergleich zu den anderen Sekundärmetaboliten am stärksten vertreten und wies an Tag 7 einen Gehalt von 25,9% des Trockengewichts auf. Zuerst konnte ein leichter Abfall beobachtet werden. Dies kann mit einer verstärkten Aktivität des Primärstoffwechsels erklärt werden. Es liegt eine vermehrte Zellteilung bei geringer Neusynthese vor. Eine vergleichbare Kultur von *Coleus blumei* in CB2-Medium zeigte ein Maximum des RA-Gehalts von 3%, und eine Melissenkultur zeigte ein Maximum von 6% (Petersen und Alfermann 1988; Weitzel und Petersen 2011). Bis zu diesem Zeitpunkt weist die Suspensionskultur von *Glechoma hederacea* neben den Suspensionskulturen von *Salvia officinalis* (36%) und *Coleus blumei* (21%) wahrscheinlich den höchsten Gehalt an RA auf (Ulbrich et al. 1985; Hippolyte et al. 1992).

Die Zuckerkonzentration scheint auch einen Einfluss auf die RA-Akkumulation zu haben, da eine Erhöhung der Saccharosekonzentration zu einer Erhöhung des RA-Gehalts in Zellkulturen von *Coleus blumei* führte (Petersen und Alfermann 1988, Gertlowski und Petersen 1993). Dennoch konnte dieses Phänomen nicht in allen Kulturen beobachtet werden. Bei Weitzel (2010) wurde in der Melissenkultur bei Verwendung des CB4-Mediums eine Erniedrigung des RA-Gehalts im Vergleich zu dem CB2-Medium festgestellt.

Oft kann eine Stimulierung der RA-Akkumulation nach Zugabe von biotischen und abiotischen Elicitoren (Abwehrstimulanzrn), z.B. Methyljasmonat, Polysaccharide wie Pektin, Chitosan, Pilzkohlenhydrate oder Hefeextrakt beobachtet werden (Sumaryono et al. 1991; Szabo et al. 1999; Bais et al. 2002; Yan et al. 2006; Karuppusamy 2009; Xiao et al. 2009; Lukmanul Hakkim et al. 2011). Bei der Untersuchung der Melissenkultur (Weitzel 2010) konnte eine verstärkte RA-Akkumulation nach Behandlung mit Methyljasmonat gemessen werden. Eine Stimulierung der RA-Produktion konnte ebenfalls mit Methyljasmonat in einer Suspensionskultur von *Coleus blumei* erzielt werden (Szabo et al. 1999).

Zukünftige Versuche könnten eine Untersuchung der *Glechoma*-Kultur in CB4-Medium sowie eine Analyse des RA-Gehalts nach Behandlung mit Elicitoren beinhalten.

3.3.2.3 Bestimmung der Enzymaktivitäten von PAL und RAS

Die spezifische PAL-Aktivität hatte ihren maximalen Wert an Tag 5 mit 49,4 $\mu\text{kat/kg}$ und sank danach bis zum Ende der Kultivierungsperiode (siehe Kapitel 3.3.1.4; Abbildung 74). Die Melissenkultur zeigte ebenfalls ein Maximum (23,4 $\mu\text{kat/kg}$) an Tag 5 (Weitzel 2010). Sykłowska-Baranek et al. (2012) beobachteten ebenfalls ein Maximum der PAL-Aktivität in den ersten Tagen in einer Suspensionskultur von *Arnebia euchroma*. Auch Ferri et al. (2011) analysierten ein PAL-Maximum in den ersten zwei Tagen in einer Zellsuspensionskultur von *Vitis vinifera*.

Die spezifische RAS-Aktivität der *Glechoma hederacea*-Suspensionskultur sank von Tag 0 bis Tag 2 und erreichte ihr Maximum an Tag 8 mit 227,1 $\mu\text{kat/kg}$ (siehe Kapitel 3.3.1.4; Abbildung 74). Auch hier wurden ähnliche Werte in der Melissenkultur von Weitzel (2010) erzielt. Das Absinken in den ersten Tagen kann mit dem vermehrten Primärstoffwechsel erklärt werden. Die RAS-Aktivität korrelierte nahezu mit der RA-Akkumulation (Abbildungen 73 und 74).

3.3.2.4 Vergleich von Dunkel- und Lichtkulturen

Mehrere Autoren konnten eine verstärkte CA-Akkumulation in Suspensionskulturen unter Lichteinfluss zeigen (Baumann und Röhrig 1989; Gillet et al. 1999). Dies kann durch einen vermehrt benötigten UV-Schutz hervorgerufen sein (Hagen et al. 2007; Clé 2008). Wu et al. (2007) untersuchten, dass die optimalen Bedingungen für eine maximale CA-Produktion in *Echinacea purpurea* eine 3/21 h Licht- und Dunkelperiode ist, wohingegen die CA-Gehalte welche in völliger Dunkelheit gewonnen wurden, deutlich niedriger sind.

Die *Glechoma*-Zellkultur wies jedoch keine vermehrte Bildung von CA nach 7-14-tägiger Lichtexposition auf (siehe Kapitel 3.3.1.5). Dies kann auf eine zu geringe Lichtexposition, eine zu kurze Beleuchtungsdauer oder andere Reaktion von *Glechoma hederacea* hinweisen. Mit einer Zeitreihe müssten die genauen CA-Gehalte von Dunkel- und Lichtkulturen miteinander verglichen werden.

Interessanterweise zeigte die Lichtkultur (3,1%) nach einer Inkubationszeit von 14 d einen fast 15-fach höheren RA-Gehalt als die Dunkelkultur (0,2%). Die Vermutung liegt nahe, dass RA-Produktion gesteigert wurde, um einen vermehrten UV-Schutz hervorzurufen. Eine verstärkte RA-Akkumulation nach 14 d wurde auch von Shiga et al. (2009) nach Belichtung von *Ocimum basilicum* L. mit Weißlicht von ca. 1 mg/g Frischgewicht auf 6 mg/g Frischgewicht beobachtet. Möglicherweise wird der UV-Schutz in *Glechoma* nicht durch CA sondern durch RA hervorgerufen.

Außerdem wurde RNA aus 7 d alten, gefriergetrockneten Dunkel- und Lichtkulturen isoliert in cDNA umgeschrieben und damit eine PCR mit EF1 α als Standard durchgeführt, um die Expression von HST, der putativen HQT, einer unbekannten HCT und der RAS zu bestimmen (siehe Abbildung 75). Es konnten auf Expressionsebene keine relevanten Unterschiede zwischen Licht- und Dunkelkultur festgestellt werden. Hier müssten noch Unter-

suchungen mit der quantitativen Real-Time-PCR erfolgen, um eine detaillierte Aussage treffen zu können. Ältere Kalluskulturen von *Pinus sylvestris* wiesen einen erhöhten Lignifizierungsgrad auf, welcher auch auf Genebene durch eine verstärkte HST-Expression detektiert werden konnte (Laukkanen et al. 2000).

3.4 Projekt 4: Untersuchungen zum Sekundärstoffwechsel von *Glechoma hederacea*-Pflanzen

3.4.1 Sekundärstoffwechsel von *Glechoma hederacea*

3.4.1.1 Optimierung der RNA-Isolierung aus Blättern, Blüten, Stängeln und Wurzeln

3.4.1.1.1 RNA-Isolierung nach Chomczynski und Sacchi

Um die optimale Methode zur RNA-Isolierung aus verschiedenen Organen von *Glechoma hederacea* zu bestimmen, wurde zunächst die Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) angewandt (siehe Kapitel 2.3.1).

Nach der Isolierung wurden die RNA-Menge und die Reinheit photometrisch bestimmt (siehe Tabelle 1). Die Qualität der RNA sowie das Fehlen von DNA wurden durch ein Agarosegel verifiziert (siehe Abbildung 76).

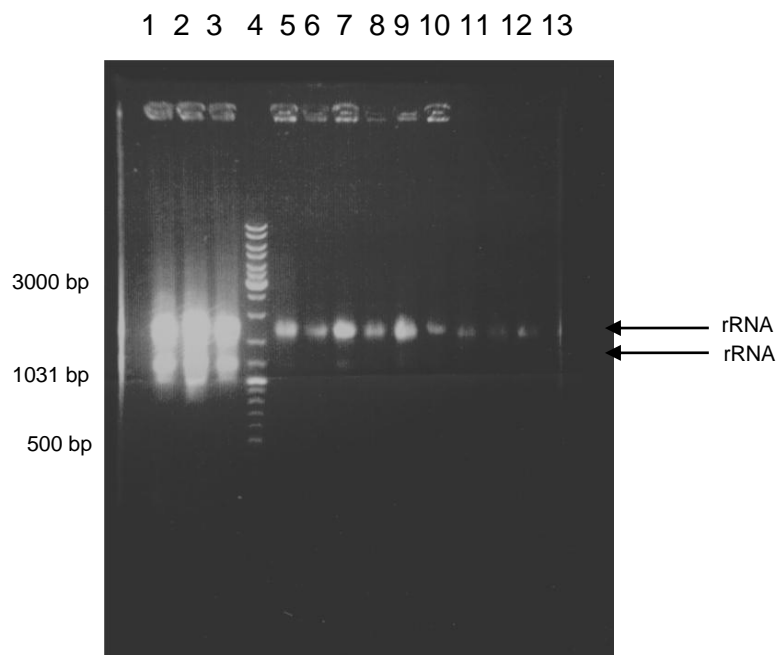


Abbildung 76: Agarosegel zur Kontrolle der RNA-Qualität aus *Glechoma*-Organen nach RNA-Extraktion nach Chomczynski und Sacchi (1987): 1, 2, 3: Blatt, 4: GeneRuler™ DNA Ladder Mix; 5, 6, 7: Blüte, 8, 9, 10: Stängel, 11, 12, 13: Wurzel

| <i>Glechoma hederacea</i>-Organ | Konzentration (µg/ml) | Absorption: A_{260/280} |
|--|------------------------------|--|
| Blatt 3 | 721 (nach 1:1-Verdünnung) | 1,93 |
| Blüte 3 | 1715 | 1,73 |
| Stängel 2 | 757 | 1,91 |
| Wurzel 3 | 572 | 1,77 |

Tabelle 1: Bestimmung der RNA-Konzentration und -Reinheit aus *Glechoma*-Organen nach RNA-Extraktion nach Chomczynski und Sacchi (1987)

Die cDNA-Synthese wurde mit Blatt 3, Blüte 3, Stängel 2 und Wurzel 3 durchgeführt (Kapitel 2.3.3) und die PCR erfolgte, wie in Kapitel 2.3.4.1 beschrieben.

3.4.1.1.2 RNA-Isolierung nach Giuliano

Außerdem wurde die RNA-Extraktionsmethode nach Giuliano (1993) durchgeführt, um die optimale RNA-Isolierungsmethode für *Glechoma* zu bestimmen (siehe Kapitel 2.3.2).

Nach dem Lösen der hellbraunen RNA beim Blatt, der dunkelgrünen RNA bei der Blüte, der weißlichen RNA beim Stängel und der braunen RNA bei der Wurzel in sterilem Wasser wurde deren Qualität durch Agarosegelelektrophorese bestimmt (siehe Abbildung 77).

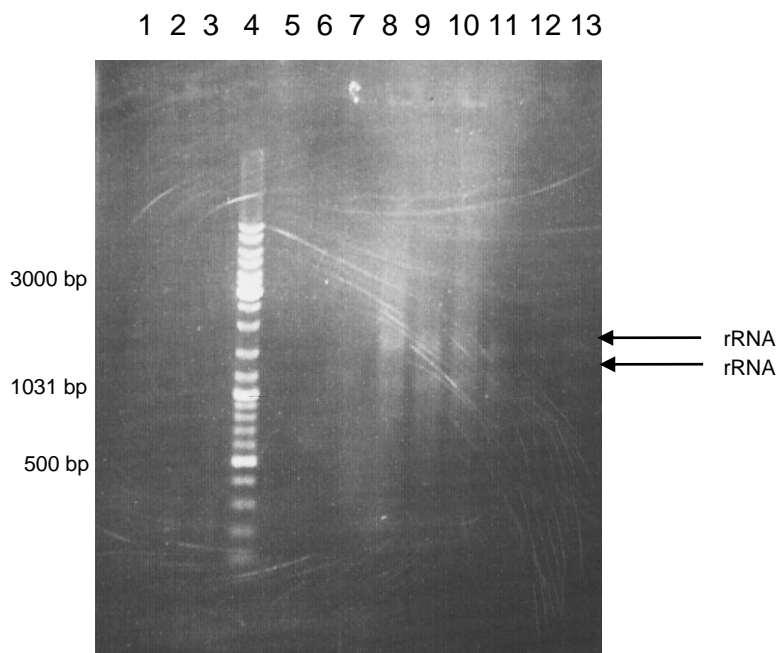


Abbildung 77: Agarosegel zur Kontrolle der RNA-Qualität aus *Glechoma*-Organen nach RNA-Extraktion nach Giuliano (1993): 1, 2, 3: Blatt, 4: GeneRuler™ DNA Ladder Mix; 5, 6, 7: Blüte, 8, 9, 10: Stängel, 11, 12, 13: Wurzel

Wie in Abbildung 77 erkennbar, sind nur bei Stängeln und ganz schwach bei Wurzeln rRNA-Banden erkennbar. Bei der photometrischen Messung wurden nur sehr geringe Konzentrationen bestimmt. Es erfolgte mit dieser RNA keine cDNA-Synthese.

3.4.1.2 Bestimmung des Temperaturoptimums für die PCR-Amplifikation verschiedener Hydroxycinnamoyltransferasen

Durch einen Temperaturgradienten mit folgenden Zwischenschritten: 50 °C, 54 °C, 58 °C, 62 °C und 66 °C wurde das jeweilige Temperaturoptimum für die PCR-Amplifikation der Hydroxycinnamoyltransferasen HST, RAS und der unbekannten HCT (Sander 2010) aus *Glechoma hederacea* bestimmt (siehe Abbildungen 78-80).

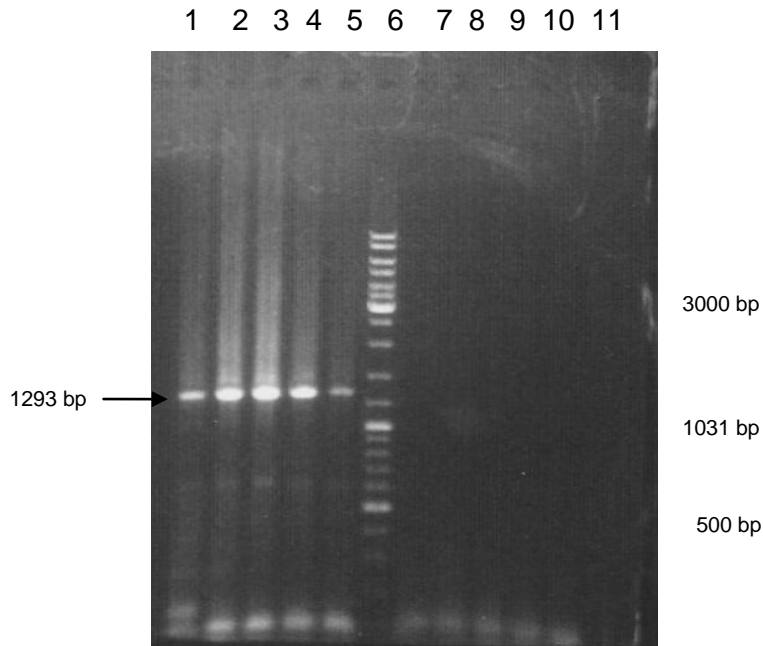


Abbildung 78: Agarosegel zur Bestimmung des Temperaturoptimums für die PCR-Amplifikation der Hydroxycinnamoyltransferasen aus *Glechoma hederacea*: 1: HCT 50 °C, 2: HCT 54 °C, 3: HCT 58 °C, 4: HCT 62 °C, 5: HCT 66 °C, 6: GeneRuler™ DNA Ladder Mix; 7: RAS 50 °C, 8: RAS 54 °C, 9: RAS 58 °C, 10: RAS 62 °C, 11: RAS 66 °C

Bei der GhHCT findet man die stärksten Banden bei 54 °C und 58 °C, die GhRAS konnte mit einem Einsatz von 0,5 µl template in der PCR nicht detektiert werden. Als nächstes wurden die Expression der GhHST und ein weiteres Mal die Expression der GhRAS bestimmt (siehe Abbildung 79).

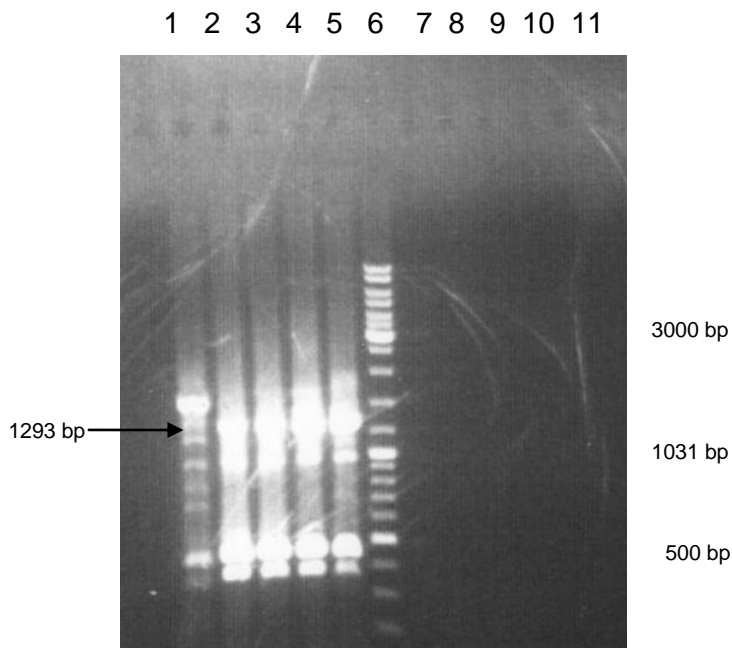


Abbildung 79: Agarosegel zur Bestimmung des Temperaturoptimums für die PCR-Amplifikation der Hydroxycinnamoyltransferasen aus *Glechoma hederacea*: 1: HST 50 °C, 2: HST 54 °C, 3: HST 58 °C, 4: HST 62 °C, 5: HST 66 °C, 6: GeneRuler™ DNA Ladder Mix; 7: RAS 50 °C, 8: RAS 54 °C, 9: RAS 58 °C, 10: RAS 62 °C, 11: RAS 66 °C

Die stärksten Banden fanden sich bei der GhHST bei 58 °C und 62 °C. Bei der GhRAS ließen sich bei dieser cDNA-Menge (0,5 µl) keinerlei Banden detektieren. Deshalb wurden 1 und 1,5 µl cDNA getestet (siehe Abbildung 80).

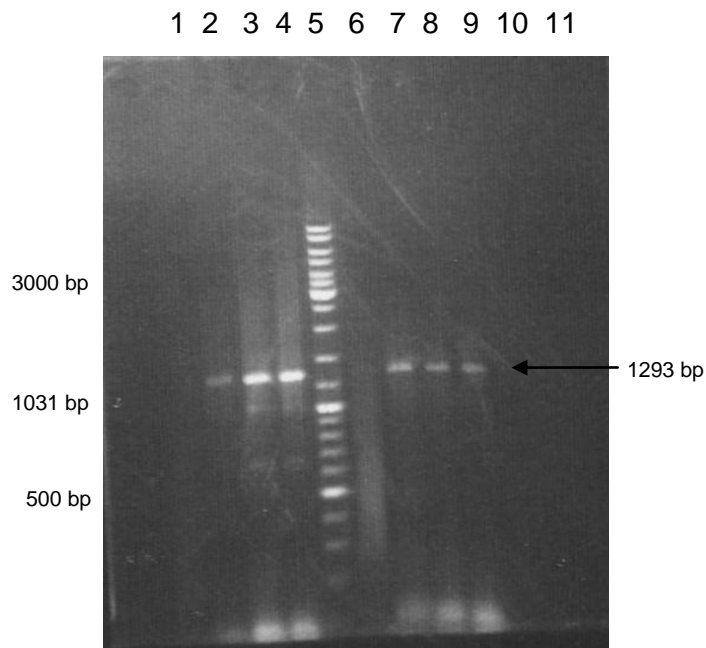


Abbildung 80: Agarosegel zur Bestimmung des Temperaturoptimums für die PCR-Amplifikation der Hydroxycinnamoyltransferasen aus *Glechoma hederacea*: RAS 1 µl 1: RAS 50 °C, 2: RAS 54 °C, 3: RAS 58 °C, 4: RAS 62 °C, 5: GeneRuler™ DNA Ladder Mix, RAS 1,5 µl 6: RAS 50 °C, 7: RAS 54 °C, 8: RAS 58 °C, 9: RAS 62 °C

Erst bei einem Einsatz von 1 bzw. 1,5 µl cDNA (siehe Abbildung 80) konnte die RAS in *Glechoma*-Blättern nachgewiesen werden. Die intensivsten Banden beobachtete man bei 58 und 62 °C.

3.4.1.3 Ergebnisse zur Untersuchung diverser „house-keeping“-Gene

3.4.1.3.1 18S-ribosomale RNA (18S-rRNA)

Einige Autoren empfehlen die 18S-rRNA als Referenzgen in der PCR (Burleigh 2001; Gonzalez et al. 2002; Kim et al. 2003; Weitzel und Petersen 2010; Weitzel und Petersen 2011). Aus diesem Grund wurde dieser Standard zuerst untersucht (siehe Abbildung 81).

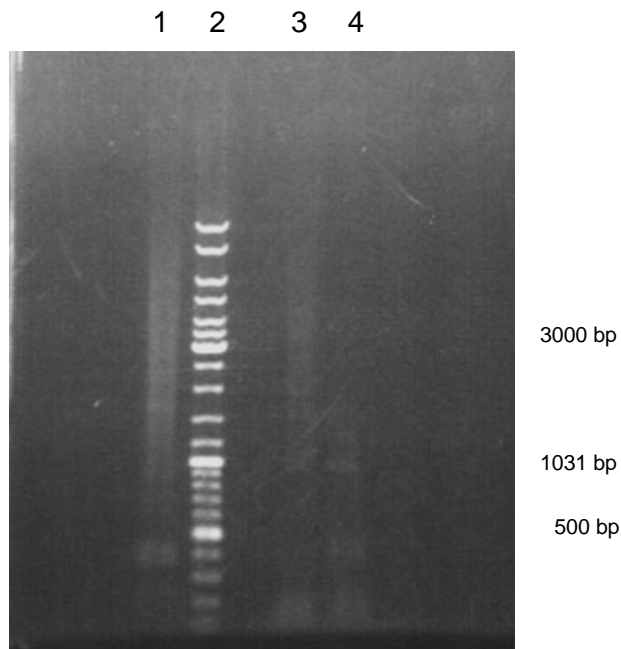


Abbildung 81: Agarosegel der PCR-Reaktionen zur Amplifikation des Referenzgens 18S-rRNA in *Glechoma hederacea*: 1: Blatt, 2: GeneRuler™ DNA Ladder Mix, 3: Stängel, 4: Wurzel

In Abbildung 81 ist erkennbar, dass in keinem der untersuchten Organe die 18S-rRNA (315 bp) detektiert werden konnte.

3.4.1.3.2 β -Aktin

Zur Standardisierung der mRNA-Expression in Blättern, Stängeln und Wurzeln von *G. hederacea* wurde ein 150 bp Teilstück von β -Aktin als interner Standard aus Blättern, Stängeln und Wurzeln von *Glechoma hederacea* bei 55 °C amplifiziert (siehe Abbildung 82).

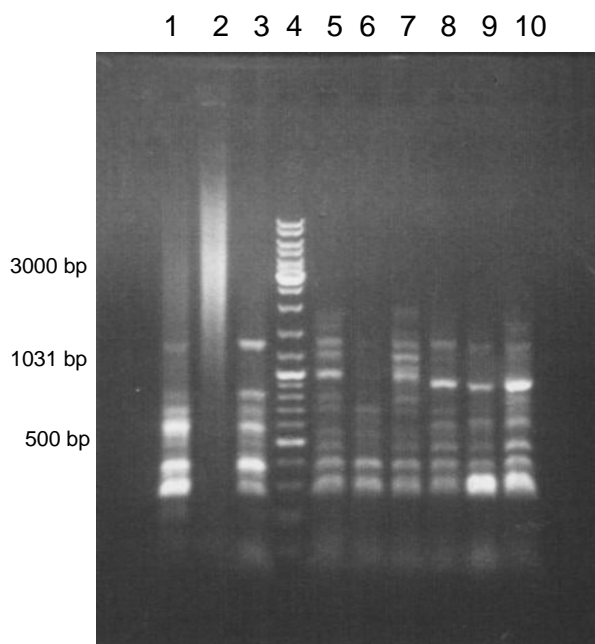


Abbildung 82: Agarosegel der PCR-Amplifikation des Referenzgens β -Aktin in *Glechoma hederacea*: Blatt 1: 0,5 μ l cDNA, 2: 1 μ l cDNA, 3: 1,5 μ l cDNA, 4: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, Stängel 5: 0,5 μ l cDNA, 6: 1 μ l cDNA, 7: 1,5 μ l cDNA, Wurzel 8: 0,5 μ l cDNA, 9: 1 μ l cDNA, 10: 1,5 μ l cDNA

Da β -Aktin mit diesen Primern leider nicht detektiert werden konnte, wurden die β -Aktinsequenzen von allen Lamiaceae in der NCBI-Datenbank über MultAlign (Stand August 2011) übereinander gelegt (siehe Kapitel 2.3.5.2). Die spezifischen, degenerierten Aktinprimer wurden konstruiert, wo die meisten Übereinstimmungen lagen. Das amplifizierte Stück sollte 313 bp betragen. Es wurde ein Temperaturgradient von 53-57 °C angewandt (siehe Abbildung 83).

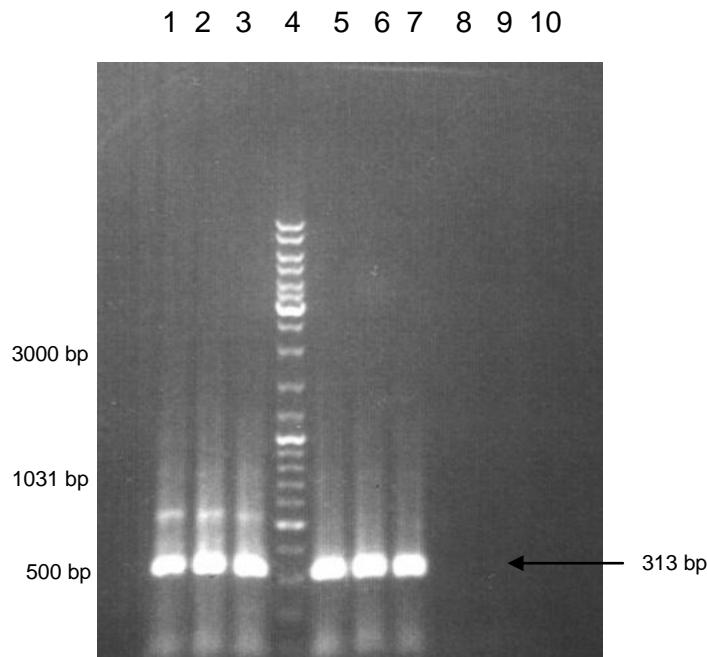


Abbildung 83: Agarosegel der PCR-Amplifikation des Referenzgens β -Aktin in *Glechoma hederacea*: Blatt 1: 0,5 μ l cDNA, 2: 1 μ l cDNA, 3: 1,5 μ l cDNA, 4: GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Stängel 5: 0,5 μ l cDNA, 6: 1 μ l cDNA, 7: 1,5 μ l cDNA, Wurzel 8: 0,5 μ l cDNA, 9: 1 μ l cDNA, 10: 1,5 μ l cDNA

Nach Einsatz der speziell entworfenen degenerierten Primer konnten Banden bei 313 bp Basenpaaren in Gh-Blättern und Gh-Stängeln nachgewiesen werden. Leider konnte in den Gh-Wurzeln bisher noch keine β -Aktin-Expression nachgewiesen werden.

3.4.1.3.3 Elongationsfaktor 1 α (EF1 α)

Außerdem wurden EF1 α -Nukleotidsequenzen von Vertretern der Lamiales aus der NCBI-Datenbank (Stand Mai 2012) in MultAlign übereinandergelegt (siehe Kapitel 2.3.5.3), um spezielle degenerierte Primer zu entwerfen (Abbildung 24). Die erwartete Bande lag bei 540 bp, und es wurde ein Temperaturgradient von 58-63 °C angewandt (siehe Abbildung 84).

Ergebnisse und Diskussion

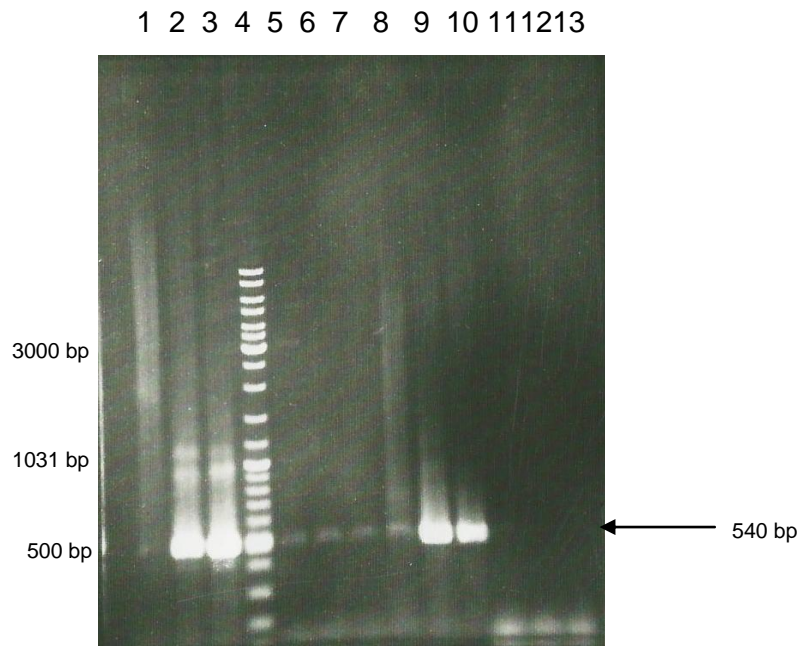


Abbildung 84: Agarosegel der PCR-Amplifikation des Referenzgens EF1 α in *Glechoma hederacea*: Blatt 1: 58 °C, 2: 62 °C, 3: 63 °C, 4: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, Blüte 5: 58 °C, 6: 62 °C, 7: 63 °C, Stängel 8: 58 °C, 9: 62 °C, 10: 63 °C, Wurzel 11: 58 °C, 12: 62 °C, 13: 63 °C

Beim Vergleich der Expressionsmenge von EF1 α in *Glechoma* fiel auf, dass die Expressionsmenge in Blatt und Stängel ähnlich zu sein scheinen. Der Gehalt in Blüten war deutlich geringer und in Wurzeln kaum nachweisbar (siehe Abbildung 84). Also wurde ein direkter Vergleich zwischen den beiden „house-keeping“-Genen β -Aktin und EF1 α gezogen (siehe Abbildung 85).

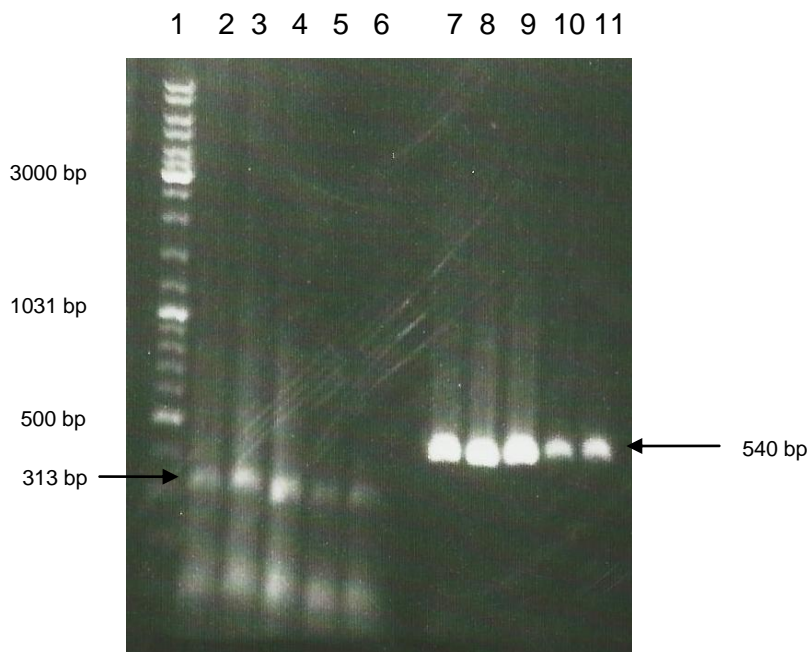


Abbildung 85: Agarosegel zum Vergleich der house-keeping-Gene β -Aktin und Ef1 α in *Glechoma hederacea*: 1: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, β -Aktin: 2: Blatt, 3: Blüte, 4: Stängel, 5: Wurzel (1 μ l cDNA), 6: Wurzel (2 μ l cDNA), Ef1 α : 7: Blatt, 8: Blüte, 9: Stängel, 10: Wurzel (1 μ l cDNA), 11: Wurzel (2 μ l cDNA)

Es war zwar nun möglich, die beiden house-keeping-Gene in der Wurzel zu detektieren, dennoch sind die Expressionsmengen deutlich schwächer als in den anderen Organen. Auch der Einsatz von 2 µl cDNA konnte die Expressionsmenge nicht steigern (siehe Abbildung 85).

Um eventuelle vorhandene Hemmstoffe in Gh-Blüte und Gh-Wurzel zu testen, wurde eine erneute PCR mit 0,5 µl Blatt-cDNA in Kombination mit 0,5 µl Blüten-cDNA und 0,5 µl Wurzel-cDNA im Vergleich mit 0,5 µl Blatt-cDNA und 0,5 µl Wasser durchgeführt (siehe Abbildung 86).

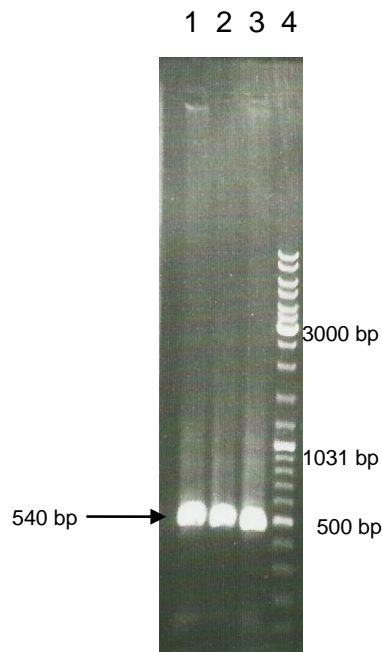


Abbildung 86: Agarosegel zur Kontrolle eventueller Hemmstoffe in Wurzeln von *Glechoma hederacea*: 1: Blatt-cDNA + H₂O, 2: Blatt-cDNA + Blüten-cDNA, 3: Blatt-cDNA + Wurzel-cDNA 4: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix

Wenn sich Hemmstoffe in der Wurzel oder Blüte befänden, müssten diese Banden im Vergleich zur Blatt-cDNA + H₂O abgeschwächt sein (siehe Abbildung 86), was aber nicht der Fall war.

3.4.1.4 Expression unterschiedlicher Hydroxycinnamoyltransferasen aus Blättern, Blüten, Stängeln und Wurzeln von *Glechoma hederacea*

Es wurde RNA aus gereinigten Blättern, Blüten, Stängeln und Wurzeln von *Glechoma* extrahiert (siehe Kapitel 2.3.1) und in cDNA umgeschrieben (siehe Kapitel 2.3.3). Anschließend wurde eine PCR-Reaktion (30 Zyklen) mit 1 µl cDNA und je 0,5 µl Primern durchgeführt (siehe Kapitel 2.3.4.2).

In Abbildung 87 ist zu erkennen, dass EF1α ein geeignetes house-keeping-Gen für Analysen in *Glechoma hederacea* ist. Außerdem wurde für jedes Gen ein Temperaturoptimum für die

Amplifikation (siehe Kapitel 3.7.3) bestimmt: HST (62 °C), die unbekannte HCT (58 °C), RAS (58 °C), EF1 α (62 °C).

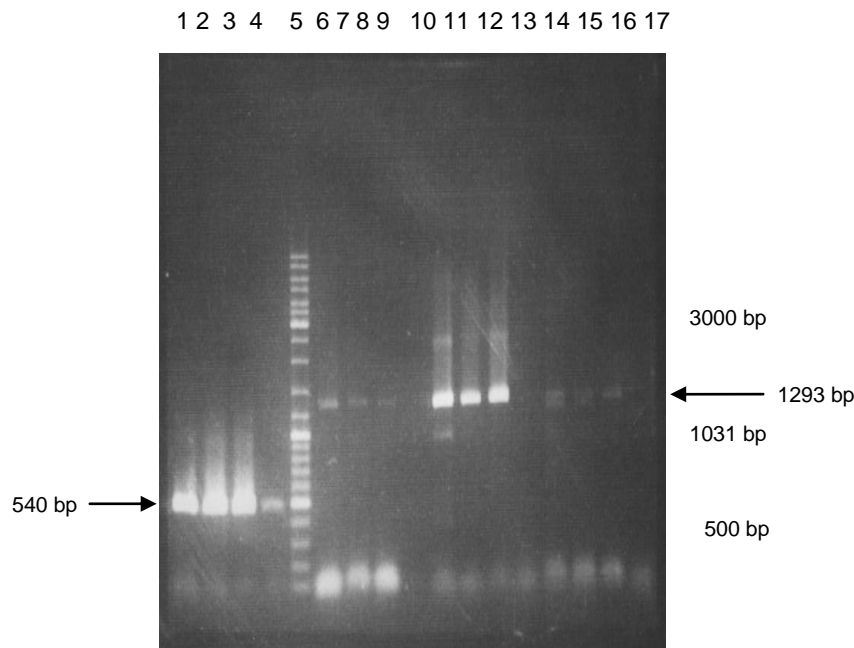


Abbildung 87: Analyse der Expression verschiedener Hydroxycinnamoyltransferasen über semi-quantitative PCR: EF1 α (62 °C) 1: Blatt, 2: Blüte, 3: Stängel, 4: Wurzel, 5: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, HCT (58 °C) 1: Blatt, 2: Blüte, 3: Stängel, 4: Wurzel, HST (62 °C) 1: Blatt, 2: Blüte, 3: Stängel, 4: Wurzel, RAS (58 °C) 1: Blatt, 2: Blüte, 3: Stängel, 4: Wurzel,

Keines der untersuchten Gene lässt sich in Wurzeln detektieren (siehe Abbildung 87). Selbst das house-keeping-Gen (EF1 α) wird deutlich schwächer exprimiert. Das GhHST-Gen wird am stärksten von allen drei untersuchten Genen exprimiert und ist in den Blüten ein wenig schwächer ausgeprägt. Es sind zwei PCR-Produkte bei GhRAS erkennbar, welche wahrscheinlich die beiden von Sander (2010) beschriebenen RAS-Gene repräsentieren.

3.4.1.5 Extraktion von Chlorogen-, Kaffee- und Rosmarinsäure aus Blättern, Blüten, Stängeln und Wurzeln von *Glechoma hederacea*

Nach dem Gefriertrocknen (16 h) der verschiedenen Pflanzenorgane, wurde das Material fein gemörsert. Nach Zugabe von 1 ml 70%igem EtOH zu 10 mg wurde, wie in Kapitel 2.3.7 beschrieben, extrahiert.

Der höchste Kaffeesäure-Gehalt wurde in Wurzeln (0,4% des Trockengewichts), der niedrigste Gehalt in Stängeln gemessen (siehe Abbildung 88). CA konnte nur in den oberirdischen Teilen detektiert werden. Die *Glechoma*-Blätter wiesen einen 2%igen-, die Blüten einen 1,6%igen- und die Stängel einen 1,3%igen-Gehalt auf. In Wurzeln konnten nur 0,005% CA gemessen werden. Während Blätter, Stängel und Wurzel einen vergleichsweise geringen RA-Gehalt aufwiesen (0,6-1,3%), konnte in den Blüten eine RA-Menge von 12,5% bestimmt werden.

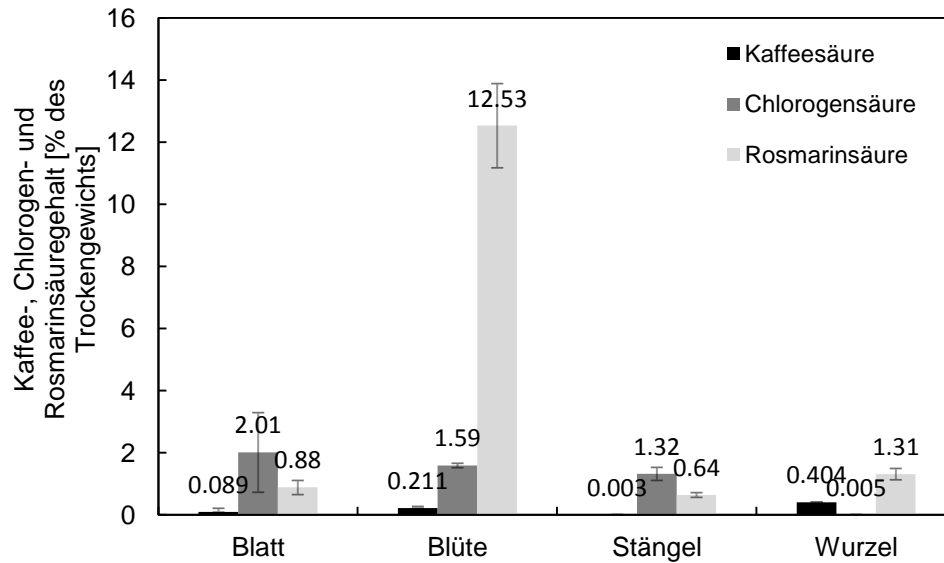


Abbildung 88: Vergleich der Kaffee-, Chlorogen- und Rosmarinsäure-Gehalte in Blättern, Blüten, Stängeln und Wurzeln von *Glechoma hederacea*

3.4.1.6 Ergebnisse zur Isolierung der cDNA oder des Gens einer Lamiaceae-HQT

3.4.1.6.1 Entwurf von HQT-Primern

Um eine HQT-Sequenz aus *G. hederacea* zu isolieren, wurden HQT-Nukleotidsequenzen von Tomate (AJ582652.1), Tabak (AJ582651.1) und Artischocke (DQ915589.1) in dem CLC-Sequence-Viewer zur Identifizierung konservierter Nukleotidbereiche übereinandergelegt (siehe Kapitel 2.3.8.1). Durch Vergleichen mit bekannten langen und kurzen HST- und RAS-Sequenzen aus *Glechoma* (Sander 2010) konnten die Unterschiede bestimmt und aus den konservierten Regionen zwei für HQT spezifische Primer identifiziert werden. Als Referenz wurde RNA aus Tabakblüten isoliert und die daraus hergestellte cDNA für die Amplifikation einer HQT mit den hierfür entworfenen Primern genutzt (siehe Abbildung 89).

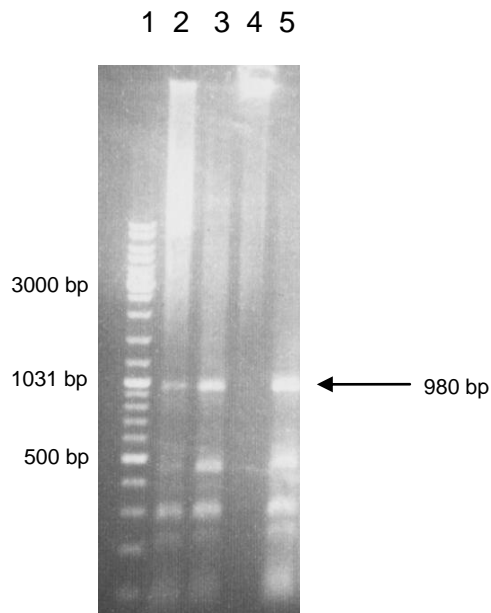


Abbildung 89: Agarosegel der HQT-Expression in *Nicotiana tabacum*-Blüten als Referenz: 1: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, 52 °C 2: 0,5 µl cDNA, 3: 1 µl cDNA; 4: 1,5 µl cDNA; 55 °C 5: 1 µl cDNA

Das HQT-Gen konnte in den Tabakblüten bei 980 bp detektiert werden (siehe Abbildung 89). Deshalb wurde versucht, das Amplifikat in der gleichen Größe auch in *Glechoma hederacea* zu detektieren (siehe Abbildung 90).

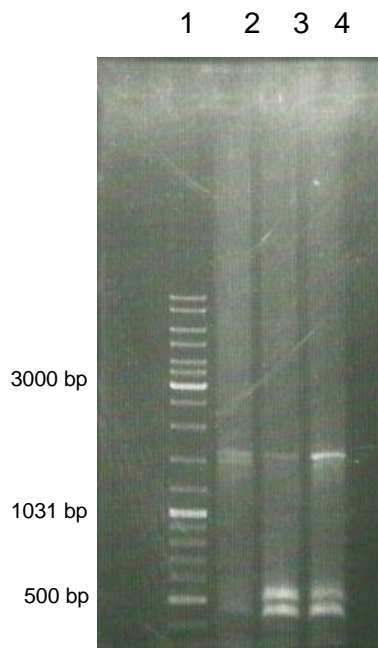


Abbildung 90: Versuch der Amplifikation einer partiellen HQT mit cDNA aus *Glechoma hederacea*: 1: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, 52 °C 2: Blatt, 3: Blüte, 4: Stängel

Da keine Bande bei 980 bp erkennbar war, wurden verschiedene cDNAs von Gh-Blüten bei 55 °C untersucht (siehe Abbildung 91). Es wurden Gh-Blüten untersucht, da sich in ihnen der höchste CA-Gehalt nachweisen ließ (siehe Abbildung 88).

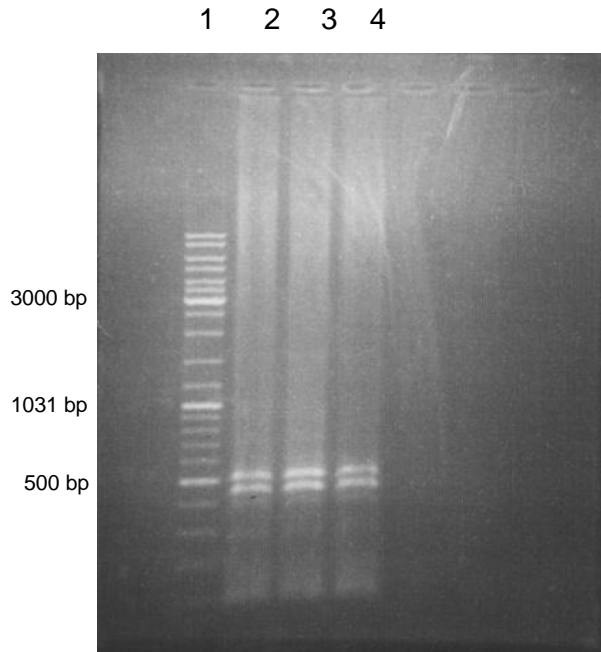


Abbildung 91: Versuch der Amplifikation einer partiellen HQT mit cDNA aus *Glechoma hederacea*: 1: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix; 55 °C 2-4: 1 µl cDNA Blüte

Da die Detektion mithilfe von cDNA nicht möglich war (siehe Abbildung 91), wurde versucht, das HQT-Genstück (980 bp) in *Glechoma hederacea* auf Basis von gDNA zu amplifizieren. Zur Kontrolle wurden einmal die Primer und das andere Mal die gDNA weggelassen (siehe Abbildung 92).

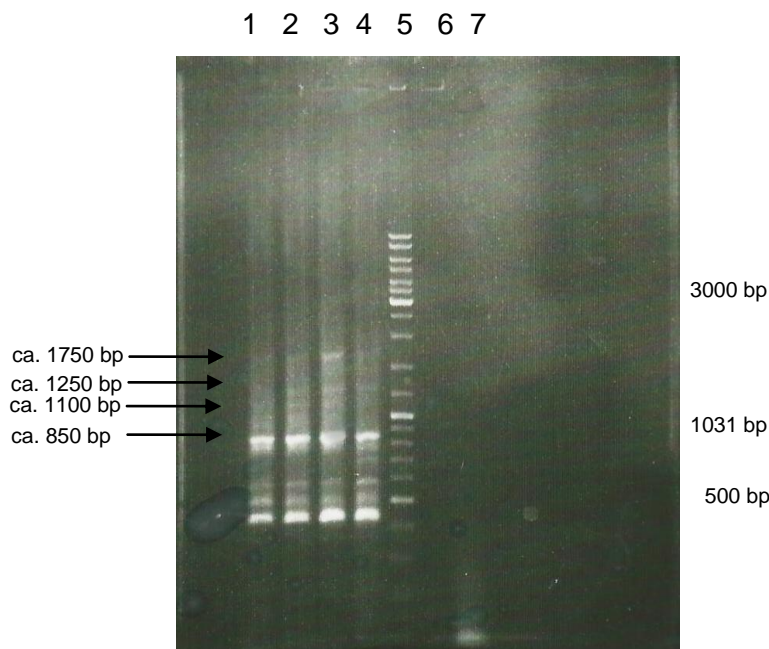


Abbildung 92: Versuch der Amplifikation einer partiellen HQT mit gDNA aus *Glechoma hederacea*: 1: 46 °C, 2: 49 °C, 3: 52 °C, 4: 55 °C, 5: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, 6: ohne Primer (55 °C), 7: ohne gDNA (55 °C)

Die Banden (siehe Pfeile in Abbildung 92) wurden ausgeschnitten und die DNA mit NucluoSpin Extract II isoliert und aufgereinigt (siehe Kapitel 2.3.8.3). Nach der Ligation in den pDrive®-Vektor (siehe Kapitel 2.3.8.4) und einer Transformation in EZ-Zellen (siehe 2.3.8.5) wurde der Transformationsansatz auf LB-Agar-Amp-X-Gal-Platten gegeben. Es wurden positive, weiße Klone gepickt, ÜN-Kulturen hergestellt (siehe Kapitel 2.1.3) und mit diesen eine Plasmidpräparation (siehe Kapitel 2.1.4) durchgeführt. Nach dem dreistündigen Verdau mit *EcoRI* (siehe Kapitel 2.3.8.6) wurde mit einem Agarosegel eine Insertkontrolle durchgeführt (siehe Abbildung 93).

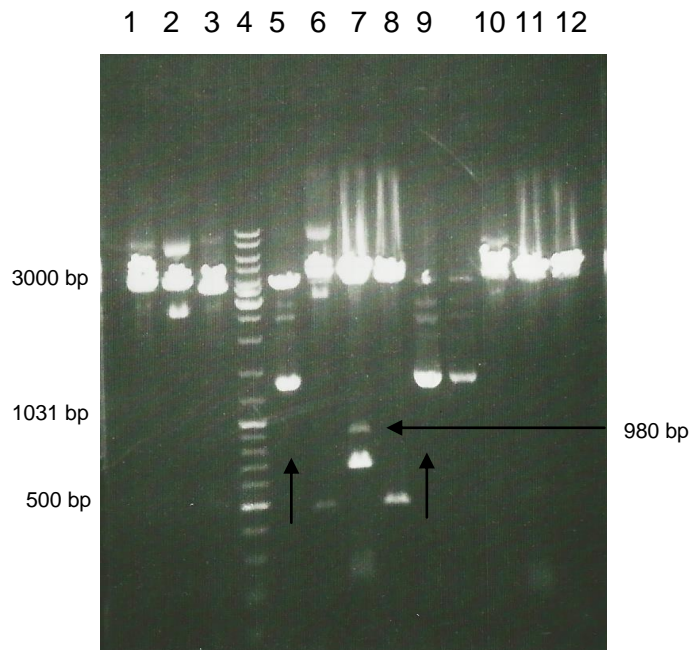


Abbildung 93: Agarosegel der Plasmidpräparation nach Verdau mit *EcoRI* der partiellen putativen HQT aus *Glechoma hederacea*: 1: Plasmid 1₁, 2: Plasmid 1₂, 3: Plasmid 1₃, 4: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, 5: Plasmid 1₄, 6: Plasmid 2₁, 7: Plasmid 2₂, 8: Plasmid 2₃, 9: Plasmid 2₄, 10: Plasmid 3₁, 11: Plasmid 3₂, 12: Plasmid 3₃

Die Plasmide 1₄, 2₂ und 2₄ wurden zum Sequenzieren zu Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) geschickt, aber leider wiesen die Sequenzen keinerlei Identitäten zu bekannten HQTs auf. Wie in den Abbildungen 91, 92 und 93 erkenntlich ist, konnte mit diesen Methoden keine Detektion der HQT aus *Glechoma hederacea* erzielt werden. Aus diesem Grund wurde mit dem Designen von CODEHOP-Primern eine andere Strategie versucht (siehe Kapitel 2.3.8.7).

3.4.1.6.2 Entwurf von HQT-Primern mithilfe des CODEHOP-Programms

Es wurden Primer aus den lückenlosen Blocks ausgewählt, welche wenig „Wobbles“ (verschiedene Basenmöglichkeiten innerhalb einer Position) sowie einen geringen Degenerierungsgrad aufwiesen (siehe Kapitel 2.3.8.7). Um die korrekte Funktionsweise zu überprüfen, wurde als Referenz wieder RNA aus *Nicotiana tabacum*-Blüten benutzt. Es wurde ein Temperaturgradient von 57-63 °C angewandt. Die gewünschte Bande befand sich bei 642 bp (siehe Abbildung 94). Die Negativkontrolle enthielt, bis auf die cDNA, alle Reagenzien der PCR.

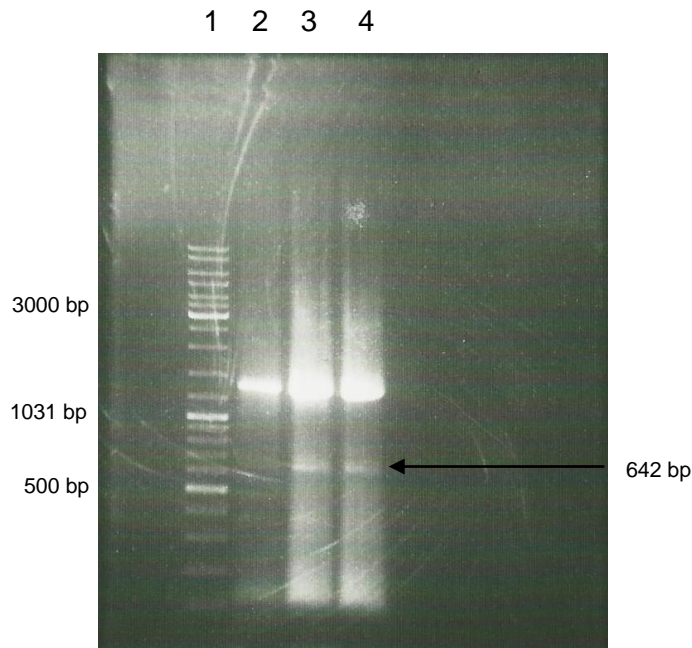


Abbildung 94: Amplifikation einer partiellen HQT-cDNA aus *Nicotiana tabacum*-Blüten als Referenz: 1: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, 1 µl cDNA: 2: 57 °C, 3: 60 °C, 4: 63 °C

Nach der Amplifikatkontrolle (642 bp) in Tabakblüten wurde versucht, die partielle HQT auch in *Glechoma hederacea* zu detektieren (siehe Abbildung 95).

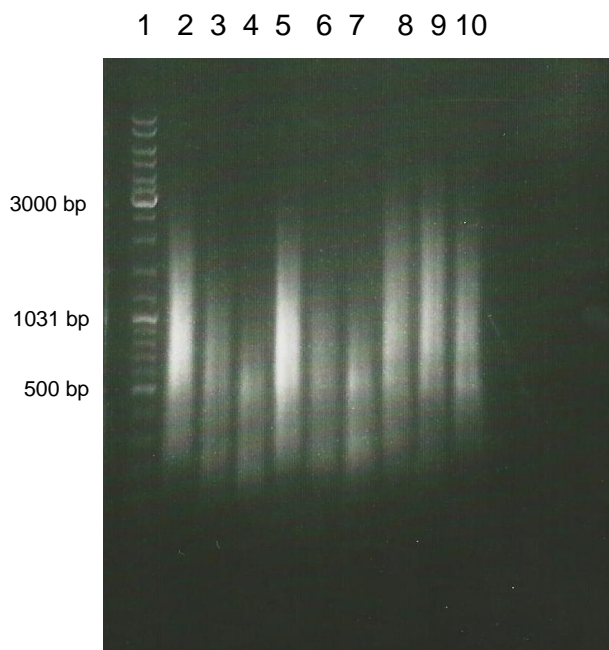


Abbildung 95: Amplifikation einer partiellen HQT-cDNA aus *Glechoma hederacea*: 1: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, 60 °C: 2: 0,5 µl cDNA, 3: 1 µl cDNA, 4: 1,5 µl cDNA, 63 °C: 5: 0,5 µl cDNA, 6: 1 µl cDNA, 7: 1,5 µl cDNA, 8-10: Negativkontrolle

Da kein HQT-Gen (Verwendung von 0,5-1,5 µl cDNA) in *Glechoma* detektiert werden konnte, wurden aus den Blocks noch einmal andere Primer bestimmt. Als Referenz diente wiederum cDNA (1 µl cDNA) aus *Nicotiana tabacum*-Blüten. Die erwartete Bande lag bei 834 bp (siehe Abbildung 96).

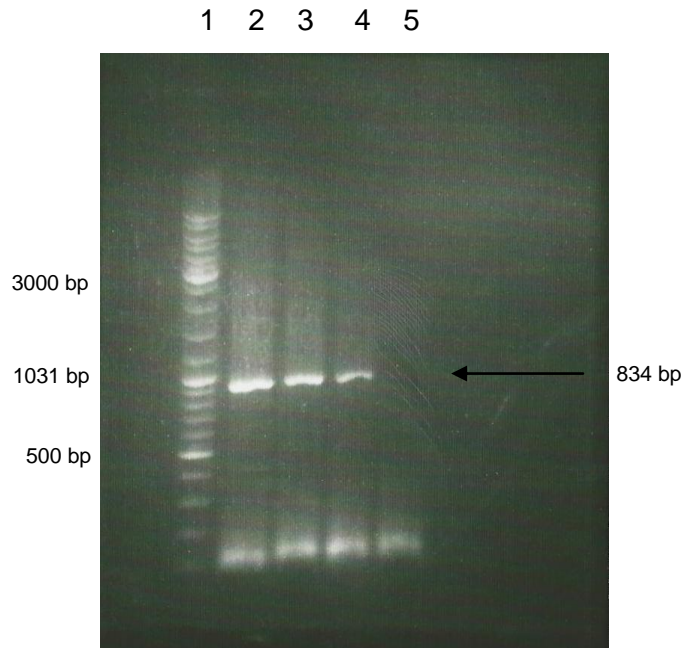


Abbildung 96: Amplifikation einer partiellen HQT-cDNA aus *Nicotiana tabacum*-Blüten als Referenz: 1: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, 2: 60 °C, 3: 63 °C, 4: 66 °C, 5: Negativkontrolle

Nach der Amplifikatkontrolle (834 bp) in Tabakblüten wurde versucht, die partielle HQT auch in *Glechoma hederacea* zu detektieren (siehe Abbildung 97).

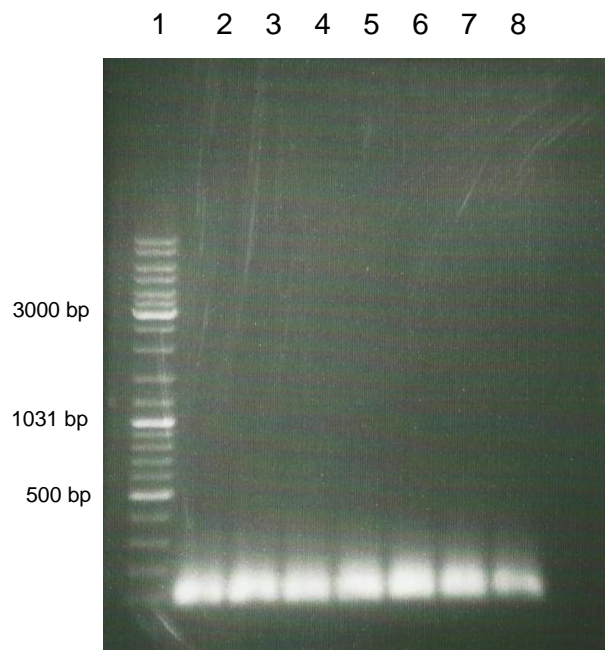


Abbildung 97: Amplifikation einer partiellen HQT-cDNA aus *Glechoma hederacea*: 1: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, 2-5: gDNA, 6: cDNA Blüte, 7: cDNA Blatt, 8: Negativkontrolle

Da diese Strategie ebenfalls nicht zum Erfolg führte (siehe Abbildung 97), wurden dieselben Primer bestellt, die zur Detektion einer HCSQT (DQ104740.1) aus *Cynara cardunculus* geführt hatten (Comino et al. 2007). Die Überprüfung der Primer wurde wieder mit cDNA (1

µl) aus Blüten von *Nicotiana tabacum* durchgeführt. Die erwartete Bande lag bei 720 bp (siehe Abbildung 98).

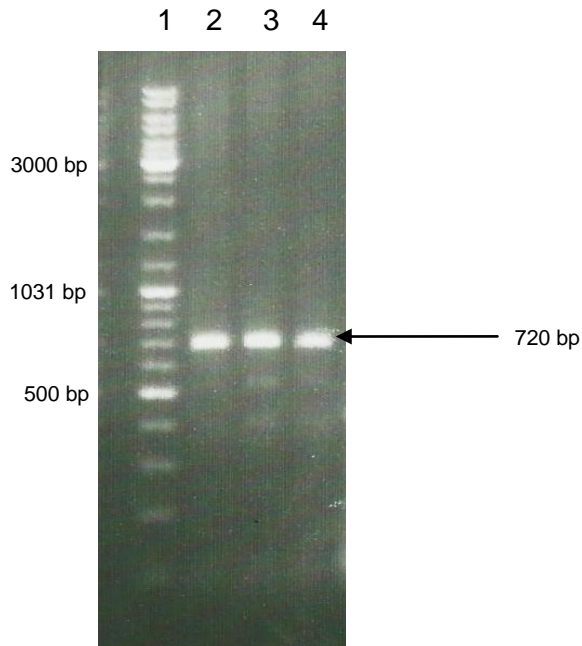


Abbildung 98: PCR-Amplifikation einer partiellen HQT-cDNA aus *Nicotiana tabacum*-Blüten als Referenz: 1: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, 2: 49 °C, 3: 52 °C, 4: 55 °C

Nach der Amplifikatkontrolle (720 bp) in Tabakblüten wurde erneut versucht, die partielle HQT auch in *Glechoma hederacea* zu detektieren (siehe Abbildung 99).

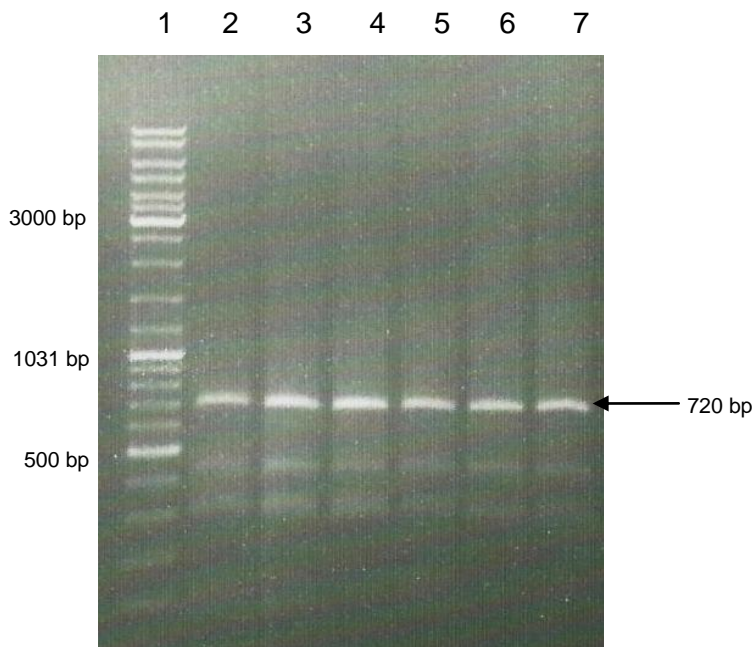


Abbildung 99: PCR-Amplifikation eines Mittelstücks der HQT aus *Glechoma hederacea*: 1: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, 2-7: cDNA bei 49 °C: 0,5 µl, 1 µl, 1,5 µl (je 2x)

Mithilfe dieser Primer konnte endlich das Amplifikat in der gewünschten Größe aus *Glechoma hederacea* detektiert werden (siehe Abbildung 99). Nach der Amplifikation des Mittelstücks sollten die unbekannten 3'- und 5'-Enden mit der RACE-PCR isoliert werden (siehe Kapitel 2.3.8.9; 2.3.8.10).

Die Banden wurden ausgeschnitten und die DNA mit NucluoSpin Extract II isoliert und aufgereinigt (siehe Kapitel 2.3.8.3). Nach der Ligation in den pDrive®-Vektor (siehe Kapitel 2.3.8.4) und einer Transformation in EZ-Zellen (siehe 2.3.8.5) wurde der Transformationsansatz auf LB-Agar-Amp-X-Gal-Platten gegeben. Es wurden positive, weiße Klone gepickt, ÜN-Kulturen (siehe Kapitel 2.1.3) hergestellt und mit diesen eine Plasmidpräparation (siehe Kapitel 2.1.4) durchgeführt. Nach dem dreistündigen Verdau mit *EcoRI* (siehe Kapitel 2.3.8.6) wurde mit einem Agarosegel eine Insertkontrolle durchgeführt (Abbildung 100).

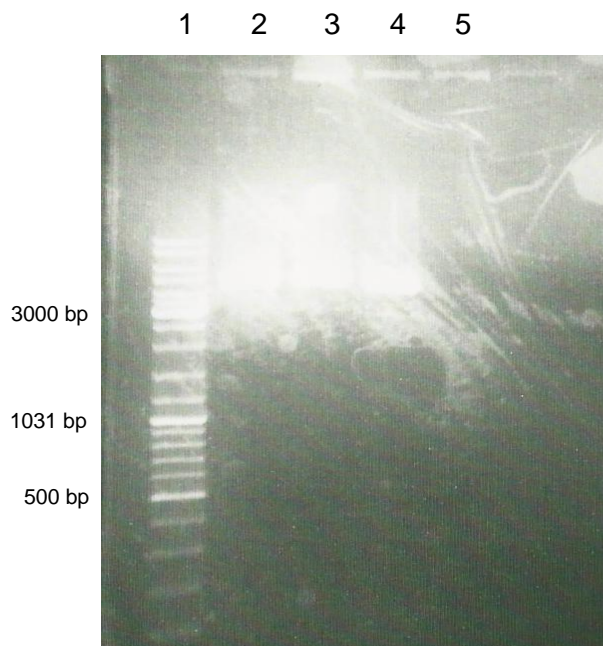


Abbildung 100: Agarosegel der Insert-Kontrolle des amplifizierten HQT-Mittelstücks aus *Glechoma hederacea*: 1: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, 2-4: Klone, 5: Negativkontrolle

Das HQT-Mittelstück wurde leider nicht eingebaut. Also wurde die Ligation in den pDrive®-Vektor noch einmal wiederholt. Entsprechend den Herstelleranweisungen wurde die genaue Menge an DNA berechnet, die in der Ligation eingesetzt werden sollte. Es erfolgte eine erneute Transformation in EZ-Zellen und eine Blau-Weiß-Selektion. Nach dem Auswählen von 16 positiven, weißen Kolonien, Hochziehen von ÜN-Kulturen, Plasmidpräparation derselben wurde diesmal ein vierstündiger Verdau mit *EcoRI* durchgeführt. Der komplette Inhalt des Verdau wurde auf zwei Agarosegelen analysiert (siehe Abbildung 101).

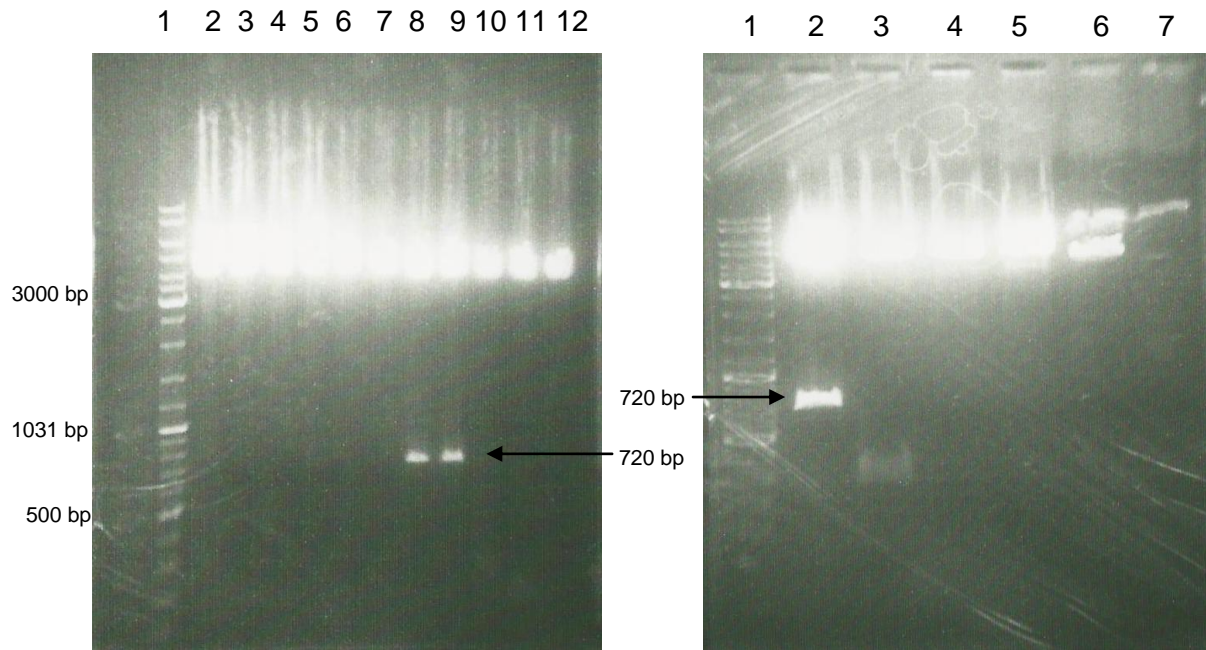


Abbildung 101: Agarosegele zur Insert-Kontrolle der Bestimmung des Mittelstücks der HQT aus *Glechoma hederacea*: 1: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, links: 2: Klon 1, 3: Klon 2, 4: Klon 3, 5: Klon 4, 6: Klon 5, 7: Klon 6, 8: Klon 7, 9: Klon 8, 10: Klon 9, 11: Klon 10, 12: Klon 11, rechts: 1: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, 2: Klon 12, 3: Klon 13, 4: Klon 14, 5: Klon 15, 6: Klon 16, 7: Negativkontrolle

20 µl der Plasmidpräparationen der drei potentiell positiven Klone (7, 8 und 12) wurden zur Sequenzanalyse zu Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) geschickt (siehe Abbildung 102).

```

TTTTATCCGATGGCGGGACGGCTGAAGAGAGACGAGGACGGTAGGGTTGAGATCGATTGCAACG
CCGAGGGAGTGCTCTTTGTGGAGGCGGAATCCGACGGATCGGTGGATGATTACGGCGATTTCGC
CCCCAATTTGGACCTGCGCCGCCTCATTCCGGCGGTGGATTACTCGCCGGGGATTTCGACCTAC
GCGCTTCTCGTGTTGCAGGTCACAAAATTCAAATGCGGCAGAGTTTCCTTAGGCGTCGGAAATGCA
GCACCACGTCGCAGATGGTTTTTCGGGGCTTCACATTCATCAATACATGGTCCGATATGGCTCGGG
GGCTCGACATCACCTCCCACCATTCATCGACCGGACCCTTCTCCTAGCACGCGATCCCCCTCA
GCCACAATTCAAGCACATCGAGTACCAGCCCGCGCCGGCCATGAAAACCTTACGATGCAACCGAG
ACTATAGTCTCTATATTCAAGCTAACTCGCGAGCAACTCACTACTCTTAAAGCCAAGTCGAAAAGAG
GATGGCAATACGGTCACCTACAGCTCGTACGAGATGCTAGCAGGGCATGTATGGCGCTGCGCCT
GCTTGGCCCGTAGCCTACCTGAAGATCAAGATACGAAGCTATACATTGCAACAGACGGGCGAGC
TAGGCTCCAGCCCCCGCTCCACAGGGCTACTTCGGTAACGTT

```

Abbildung 102: Nukleotidsequenz des putativen HQT-Mittelstücks aus *Glechoma hederacea*

Der Sequenzvergleich der drei positiven Klone auf Nukleotidebene in der NCBI-Datenbank zeigte (Stand November 2013):

- 100%-Identität mit einer HQT aus zwei verschiedenen *Cynara scolymus*-Varianten (DQ915589.1, DQ915590.1)
- 85%-Identität zu einer HCSQT aus *Salvia miltiorrhiza* (EU358958.1)

Anhand der Sequenz des Mittelstücks wurden mithilfe der Primerdesignsoftware von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) die Primer (farbig markiert) für die Ermittlung des 3'- und 5'-Endes durch RACE-PCR designt.

| Primername | Sequenz (bp) | Schmelztemperatur (°C) |
|---------------------|---|------------------------|
| RACE-Q _T | 5'-CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3' | 73,4 |
| RACE-Q _o | 5'-CCAGTGAGCAGAGTGACG-3' | 58,2 |
| RACE-Q _i | 5'-GAGGACTCGAGCTCAAGC-3' | 58,2 |
| HQT-3'GSP1 | 5'-CGATTTGCGCCCCCAATTTGGAC-3' | 62,1 |
| HQT-3'GSP2 | 5'-ATTTCGACCTACGCGCTTCTCG-3' | 62,1 |
| HQT-GPRT | 5'-AGGTGACCGTATTGCCATCCTC-3' | 62,1 |
| HQT-5'GSP1 | 5'-GTGAAGCCCGGAAAAACCATCG-3' | 62,1 |
| HQT-5'GSP2 | 5'-TTCCGACGCGCTAAGGAAACTCC-3' | 62,1 |

3.4.1.6.3 Ergebnisse der Amplifikation des 3'-Endes mittels RACE-PCR

Bei der cDNA-Synthese für eine 3'-RACE-PCR wurde die mRNA mithilfe des Q_T-Primers revers transkribiert (Scotto-Lavino et al. 2006a; Abbildung 28). Das 3'-Ende wurde mit dem Q_o-Primer (Q_o = Q_{outer}) amplifiziert. Dieser bindet an die cDNA am 3'-Ende. Außerdem wurde noch ein genspezifischer Primer (GSP-1) benötigt, der mit dem Zielgen hybridisiert. Die zweite PCR wurde mithilfe des Q_i-Primers und des GSP2-Primers durchgeführt und es folgte die Analyse der PCR-Produkte über ein Agarosegel (siehe Abbildung 103).

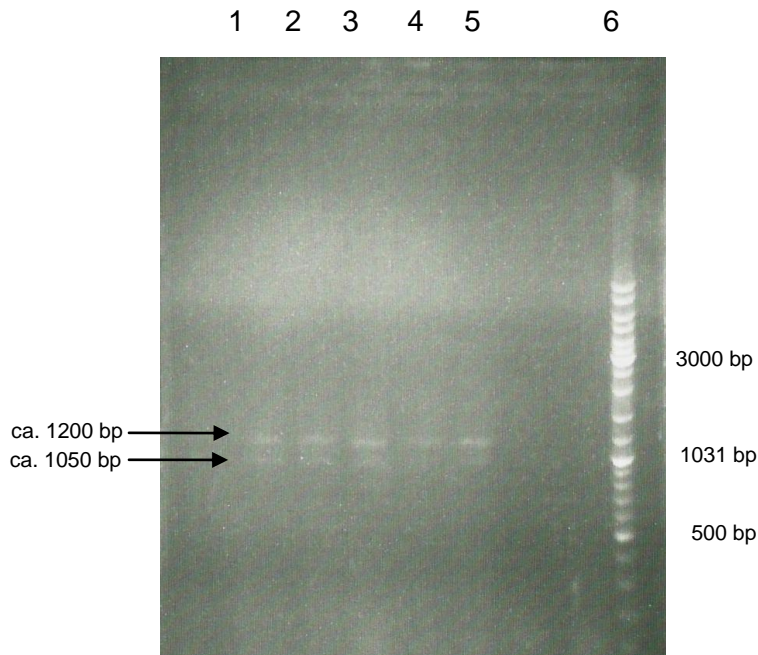


Abbildung 103: Agarosegel zur Amplifikation des 3'-Endes der HQT aus *Glechoma hederacea* mit der 3'-RACE-PCR: 1: 53 °C, 2: 53 °C, 3: 55 °C, 4: 57 °C, 5: 57 °C, 6: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix

Da nicht eindeutig erkennbar war, welche Bande das gewünschte Amplifikat (1182 bp) repräsentierte, wurden beide Banden ausgeschnitten (Pfeile in Abbildung 103) und aufgereinigt (siehe Kapitel 2.3.8.3). Nach der Ligation in den pDrive®-Vektor (siehe Kapitel 2.3.8.4), Transformation in EZ-Zellen (siehe Kapitel 2.3.8.5) Restriktionsverdau (siehe Kapitel 2.3.8.6), Anziehen von ÜN-Kulturen (siehe Kapitel 2.1.3), einer Plasmidpräparation (siehe Kapitel 2.1.4) und Verdau (siehe Kapitel 2.3.8.6), erfolgte die Insert-Kontrolle durch zwei Agarosegele (siehe Abbildung 104).

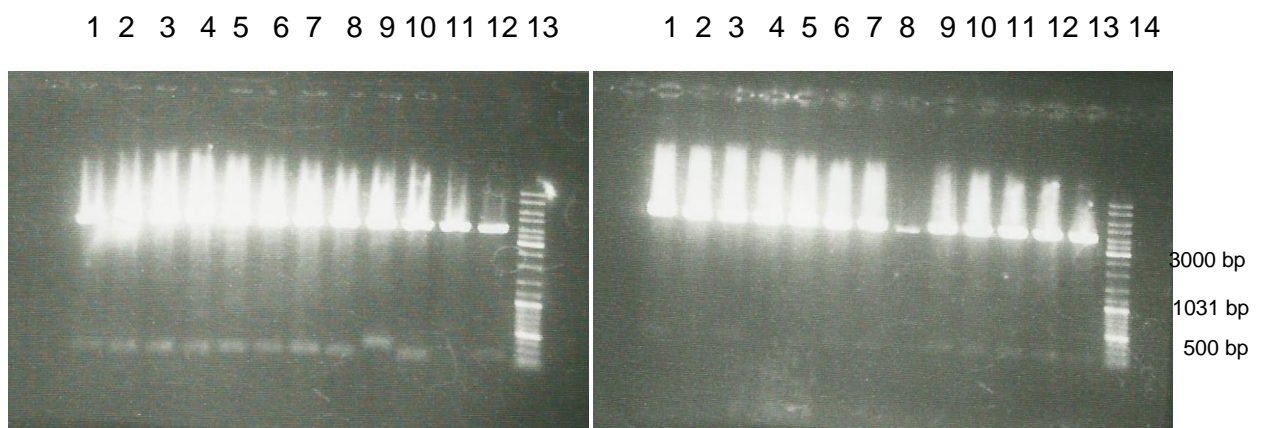


Abbildung 104: Agarosegele zur Insert-Kontrolle der Bestimmung des 3'-Endes der HQT aus *Glechoma hederacea* mit der RACE-PCR: links: 1: Klon 12, 2: Klon 11, 3: Klon 10, 4: Klon 9, 5: Klon 8, 6: Klon 7, 7: Klon 6, 8: Klon 5, 9: Klon 4, 10: Klon 3, 11: Klon 2, 12: Klon 1, 13: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, rechts: 1: Klon 24, 2: Klon 23, 3: Klon 22, 4: Klon 21, 5: Klon 20, 6: Klon 19, 7: Klon 18, 8: Klon 17, 9: Klon 16, 10: Klon 15, 11: Klon 14, 12: Klon 13, 13: Klon 12, 14: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix

Da das Insert leider nicht eingebaut wurde (siehe Abbildung 104), wurde eine erneut eine 3'-RACE-PCR durchgeführt. Bei der Ausführung der zweiten PCR, wurde unverdünntes

template der ersten PCR eingesetzt (siehe Kapitel 2.3.8.9). Die erwartete Bande lag bei 1182 bp (siehe Abbildung 105).

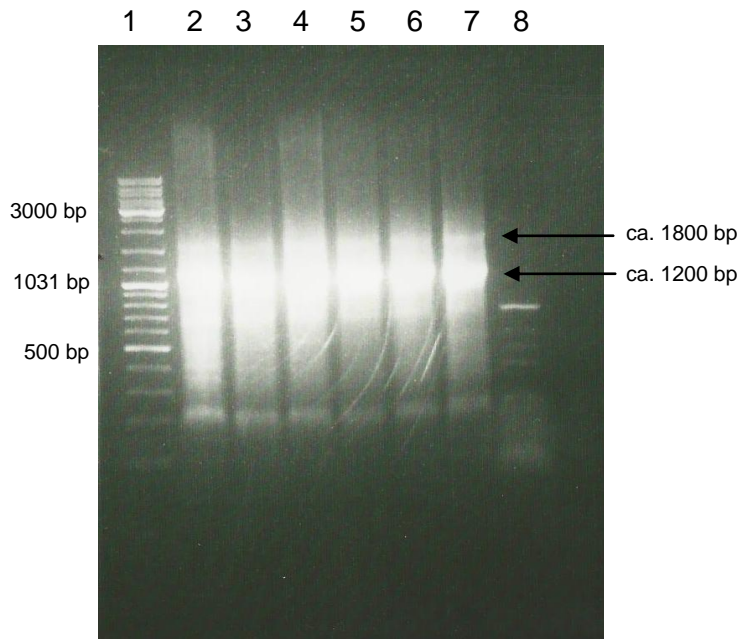


Abbildung 105: Agarosegel zur Bestimmung des 3'-Endes der HQT aus *Glechoma hederacea* mit der RACE-PCR: 1: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, 2: 53 °C, 3: 53 °C, 4: 55 °C, 5: 55 °C, 6: 57 °C, 7: 57 °C, 8: Negativkontrolle

Die beiden Banden wurden ausgeschnitten (Pfeile, siehe Abbildung 105) und aufgereinigt (siehe Kapitel 2.3.8.3). Nach der Ligation in den pDrive®-Vektor (siehe Kapitel 2.3.8.4), Transformation in EZ-Zellen (siehe Kapitel 2.3.8.5) Restriktionsverdau (siehe Kapitel 2.3.8.6), Anziehen von ÜN-Kulturen (siehe Kapitel 2.1.3), einer Plasmidpräparation (siehe Kapitel 2.1.4) und Verdau (siehe Kapitel 2.3.8.6), erfolgte die Insert-Kontrolle durch zwei Agarosegele. Die erwartete Bande lag bei 1182 bp (Pfeile in Abbildung 106).

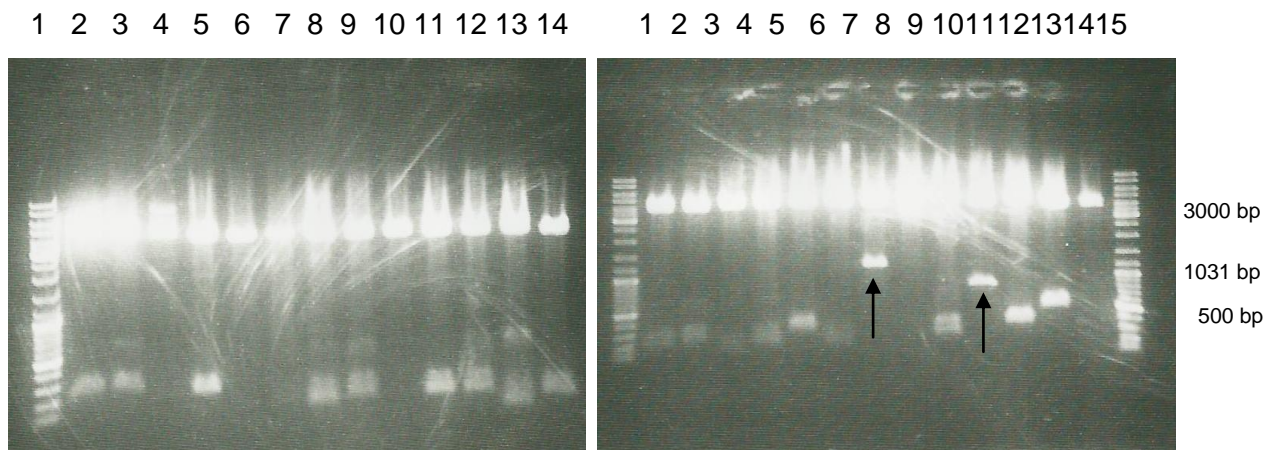


Abbildung 106: Agarosegele zur Insert-Kontrolle der Bestimmung des 3'-Endes der HQT aus *Glechoma hederacea* mit der RACE-PCR: links: 1: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, 2: Klon 1, 3: Klon 2, 4: Klon 3, 5: Klon 4, 6: Klon 5, 7: Klon 6, 8: Klon 7, 9: Klon 8, 10: Klon 9, 11: Klon 10, 12: Klon 11, 13: Klon 12, 14: Klon 13, rechts: 1: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, 2: Klon 14, 3: Klon 15, 4: Klon 16, 5: Klon 17, 6: Klon 18, 7: Klon 19, 8: Klon 20, 9: Klon 21, 10: Klon 22, 11: Klon 23, 12: Klon 24, 13: Klon 25, 14: Klon 26, 15: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix

20 µl der Plasmidpräparationen der zwei potentiell positiven Klone (20 und 23; siehe Abbildung 106) wurden zur Sequenzanalyse zu Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) geschickt.

Der Sequenzvergleich des positiven Klons 20 auf Nukleotidebene in der NCBI-Datenbank (Stand November 2011) ergab eine 85%ige Identität zu einer HCSQT aus *Salvia miltiorrhiza* (EU358958.1)

Die 3'-Sequenz (blau) wurde unter Elimination übereinstimmender Bereiche an das Mittelstück (schwarz) gehängt (siehe Abbildung 107).

```
TTTTATCCGATGGCGGGACGGCTGAAGAGAGACGAGGACGGTAGGGTTGAGATCGATTGCAACG
CCGAGGGAGTGCTCTTTGTGGAGGCGGAATCCGACGGATCGGTGGATGATTACGGCGATTTTCG
CCCCAATTTGGACCTGCGCCGCCTCATTCCGGCGGTGGATTACTCGCCGGGGATTTCGACCTAC
GCGCTTCTCGTGTTGCAGGTCACAAAATTCAAATGCGGCGGAGTTTCCTTAGGCGTCGGAATGCA
GCACCACGTCGCCGATGGTTTTTCCGGGCTTCACTTCATCAATACATGGTCCGATATGGCTCGGG
GGCTCGACATCACCCCTCCCACCATTTCATCGACCGGACCCTTCTCCTAGCACGCGATCCCCCTCA
GCCACAATTCAAGCACATCGAGTACCAGCCCGCGCCGGCCATGAAACTTACGATGCAACCGAG
ACTATAGTCTCTATATTCAAGCTAACTCGCGAGCAACTCACTACTCTTAAAGCCAAGTCGAAAGAG
GATGGCAATACGGTCACCTACAGCTCGTACGAGATGCTAGCAGGGCACGTATGGCGCTGCGCCT
GCTTGGCCCCGTAGCCTACCTGAAGATCAAGATACGAAGCTATACATTGCAACAGACGGGCGAGC
CAGGCTCCAGCCCCCGCTCCACAGGGCTATTTTGGCAACGTGATCTTCACAGCCACGCCCTG
GCTGTGGCAGGGGACCTGGAGTCCAAGCCCGTCTGGTATGCTGCTAGTAAGATCCACGATGCAT
TAGCCCGGATGGACAACGAGTACTTGAGATCCGCTCTCGACTACTTGGAGCTGCAGCCTGATCT
CAAGGCGCTCGTTTCGCGGCGCCACACGTTTAGGTGCCCTAATCTCGGGATAACGAGTTGGGTG
AGGCTTCCAATCCATGATGCTGATTTTGGGTGGGGGAGGCCGATCTTTATGGGGCCGGGTGGCA
TAGCGTACGAGGGCCTCAGCTTTGTGCTGCCTAGCCAGCCAACGACGGGAGCCTATCGGTTGC
GATTTCACTGCAGGCAGAGCATATGAAGCTTTTTGAGAAGCTGCTCTATGATATTTGAGTTCCATA
TTTCTTGACTGTGAGTCTAAAGACTTTTCGTTTTTGCACATTATCCCCTTTTTTTACCTCAGTAACAT
GTATGCAGATGTAAGATATGCCAATTTGTAAGGATTTTGATGCAGTTCTTGCATCACTATTTCATGA
AATTCTTCATGGTGTGCTAATAGGTAAAGTGCAATTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCTTGAGCTCG
AGTCCTC
```

Abbildung 107: Nukleotidsequenz des HQT-Mittelstücks (schwarz) und des 3'-Endes (blau) aus *Glechoma hederacea*. Das potentielle Stoppcodon ist farbig markiert.

Beim Sequenzvergleich in der NCBI-Datenbank lag eine 85%ige Identität zu einer HCSQT aus *Salvia miltiorrhiza* (EU358958.1) und eine 100%ige Identität mit einer HQT aus zwei verschiedenen *Cynara scolymus*-Varianten (DQ915589.1, DQ915590.1) vor (Stand November 2013).

Auf AS-Ebene waren die für BAHD-typischen HxxxD- und DFGWG-Motive (D'Auria 2006) erkennbar (siehe Abbildung 108).

```
FYPMAGRLKRDEDGRVEIDCNAEGVLFVEAESDGSVDDYGDFAPNLD
LRRLIPAVDYSPGISTYALLVLQVTKFKCGGVSLGVGMQHHVADGFSG
LHFINTWSDMARGLDITLPPFIDRTL LLLARDPPQPQFKHIEYQPAPAMK
TYDATETIVSIFKL TREQLTTLKAKSKEDGNTVTYSSYEMLAGHVWRC
ACLARSLPEDQDTKLYIATDGRARLQPPLPQGYFGNVIFTATPLAVAG
DLESKPVWYAASKIHDALARM DNEYLRSA LDYLELQPD LKALVRGAHT
FRCPNLGITSWVRLPIHDA DFGWG RPIFMGPGGIAYEGLSFVLPSPAN
DGSLSVAISLQAEHMKLFEKLLYDI
```

Abbildung 108: AS-Sequenz des HQT-Mittelstücks und des 3'-Endes aus *Glechoma hederacea*, die beiden konservierten Motive sind fett dargestellt

Der Sequenzvergleich auf AS-Ebene in der NCBI-Datenbank zeigte eine 91%ige Identität zu der von Sander (2010) isolierten HST aus *Coleus blumei*. Außerdem konnte eine 91%ige Identität zu einer HCSQT aus *Salvia miltiorrhiza* (EU358958.1) und eine 85%ige Identität zu einer HCSQT zu *Coffea canephora* (EF137954.1) festgestellt werden (Stand November 2011).

3.4.1.6.4 Versuch der Amplifikation des 5'-Endes mittels RACE-PCR

Um das 5'-Ende zu generieren, wurde die Reverse Transkription mithilfe eines GPRT-Primers durchgeführt (Scotto-Lavino et al. 2006b; Abbildung 29). Daran wurde mittels Tdt und dATP ein Poly-A-Schwanz gehängt. Die Amplifikation wurde durch den Hybridprimer Q_T erzielt, an welchem der zweite Strang synthetisiert wird, außerdem durch den Q₀-Primer und einen GSP1-Primer. Mit einer „nested“-PCR erfolgte die Amplifikation der spezifischen Produkte. Es folgte die Analyse der PCR-Produkte mittels Agarosegel und die erwartete Bande lag bei etwa 640 bp (siehe Pfeile in Abbildung 109).

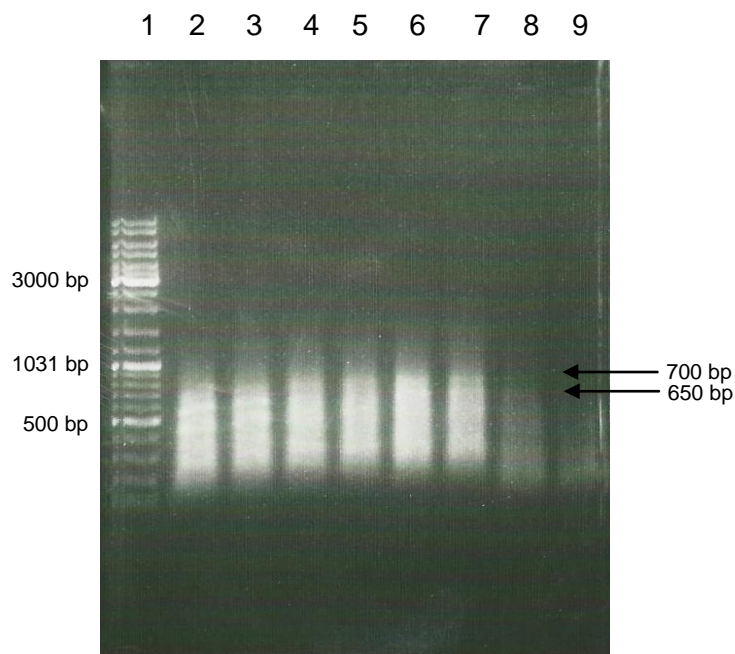


Abbildung 109: Agarosegel zur Bestimmung des 5'-Endes der HQT aus *Glechoma hederacea* mit der 5'-RACE-PCR: 1: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, 2: 53 °C, 3: 53 °C, 4: 55 °C, 5: 55 °C, 6: 57 °C, 7: 57 °C, 8: Negativkontrolle, 9: Negativkontrolle

Die infrage kommenden Banden (siehe Pfeile in Abbildung 109) wurden ausgeschnitten und aufgereinigt (siehe Kapitel 2.3.8.3). Nach der Ligation in den pDrive®-Vektor (siehe Kapitel 2.3.8.4), Transformation in EZ-Zellen (siehe Kapitel 2.3.8.5) Restriktionsverdau (siehe Kapitel 2.3.8.6), Anziehen von ÜN-Kulturen (siehe Kapitel 2.1.3), einer Plasmidpräparation (siehe Kapitel 2.1.4), Verdau (siehe Kapitel 2.3.8.6), erfolgte die Insert-Kontrolle durch zwei Agarosegele (siehe Abbildung 110), wobei die erwartete Bande bei 640 bp lag.

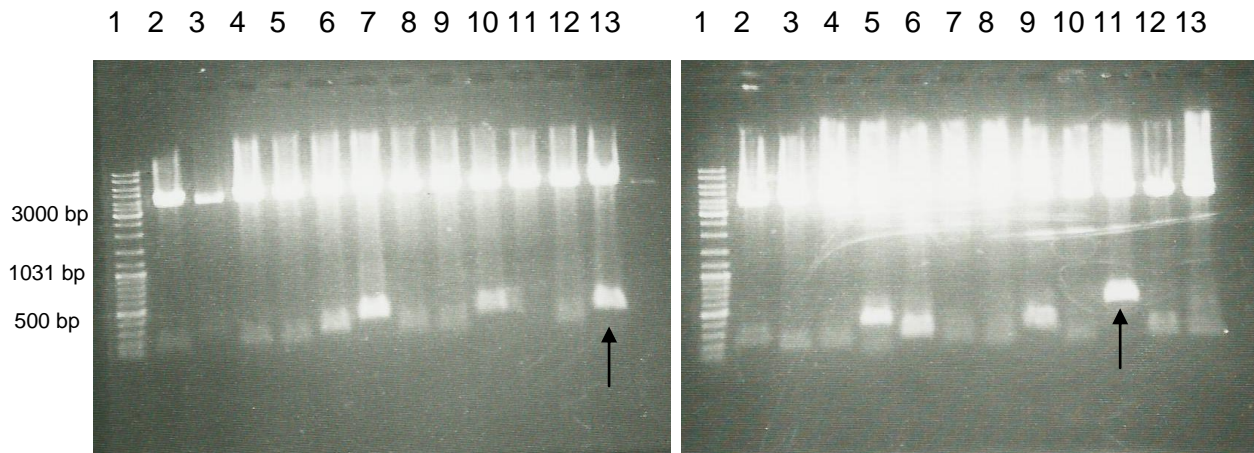


Abbildung 110: Agarosegele zur Insert-Kontrolle der Bestimmung des 5'-Endes der HQT aus *Glechoma hederacea* mit der 5'-RACE-PCR: links: 1: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, 2: Klon 1, 3: Klon 2, 4: Klon 3, 5: Klon 4, 6: Klon 5, 7: Klon 6, 8: Klon 7, 9: Klon 8, 10: Klon 9, 11: Klon 10, 12: Klon 11, 13: Klon 12, rechts: 1: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, 2: Klon 13, 3: Klon 14, 4: Klon 15, 5: Klon 16, 6: Klon 17, 7: Klon 18, 8: Klon 19, 9: Klon 20, 10: Klon 21, 11: Klon 22, 12: Klon 23, 13: Klon 24

20 µl der Plasmidpräparationen der zwei potentiell positiven Klone (12 und 22) wurden zur Sequenzanalyse zu Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) geschickt (siehe Abbildung 110).

Der Sequenzvergleich des positiven Klons 22 auf Nukleotidebene in der NCBI-Datenbank (Stand November 2013) ergab eine 89%ige Identität zu einer HCSQT aus *Salvia miltiorrhiza* (EU358958.1) und eine 86%ige Identität zu der von Sander (2010) isolierten HST aus *Coleus blumei* (FN647681.1).

Die 5'-Sequenz (rot) wurde unter Elimination doppelt vorkommender Sequenzbereiche an das Mittelstück und an das 3'-Ende gehängt (schwarz) (siehe Abbildung 111).

CCACACCCCAGCGTCTACTTCTACCGCCCCGACGGCGGGCGCCGCGGGCGGCGGCGATTCTTCGA
CACGGCGGTGATGAAGGCGGGCGCTCGGCCGCGCGCTGGTGCCGTTCTACCCCATGGCGGGGA
GGCTGAAGAGAGACGAGGACGGTAGGGTTGAGATCGATTGCAACGCCGAGGGAGTGCTCTTTG
TGGAGGCGGAATCCGACGGATCGGTGGATGATTACGGCGATTTGCCCCCAATTTGGAGCTGCG
CCGCCTCATTCCGGCGGTGGATTACTCGCAGGGGATTTGACCTACGCGCTCCTCGTGTTGCAG
GTCACAAAATTCAAATGCGGCGGAGTTTCCTTAGGCGTCGGAATGCAGCACACGTCGCCGATG
GTTTTTCCGGGCTTCACTTCATCAATACATGGTCCGATATGGCTCGGGGGGCTCGACATCACCTC
CCACCATTTCATCGACCGGACCCTTCTCCTAGCACGCGATCCCCCTCAGCCACAATTCAAGCACAT
CGAGTACCAGCCCGCGCCGGCCATGAAACTTACGATGCAACCGAGACTATAGTCTCTATATTCA
AGCTAACTCGCGAGCAACTCACTACTCTTAAAGCCAAGTCGAAAGAGGATGGCAATACGGTCACC
TACAGCTCGTACGAGATGCTAGCAGGGCACGTATGGCGCTGCGCCTGCTTGGCCCGTAGCCTAC
CTGAAGATCAAGATACGAAGCTATACATTGCAACAGACGGGCGAGCCAGGCTCCAGCCCCCGCT
CCCACAGGGCTATTTTTGGCAACGTGATCTTCACAGCCACGCCCTGGCTGTGGCAGGGGACCTG
GAGTCCAAGCCCGTCTGGTATGCTGCTAGTAAGATCCACGATGCATTAGCCCGGATGGACAACG
AGTACTTGAGATCCGCTCTCGACTACTTGGAGCTGCAGCCTGATCTCAAGGCGCTCGTTTCGCGG
CGCCACACGTTTAGGTGCCCTAATCTCGGGATAACGAGTTGGGTGAGGCTTCCAATCCATGAT
GCTGATTTTGGGTGGGGGAGGCCGATCTTTATGGGGCCGGGTGGCATAGCGTACGAGGGCCTC
AGCTTTGTGCTGCCTAGCCAGCCAACGACGGGAGCCTATCGGTTGCGATTTCACTGCAGGCAG

Ergebnisse und Diskussion

AGCATATGAAGCTTTTTGAGAAGCTGCTCTATGATATTTGAGTTCCATATTTCTTGACTGTGAGTCT
AAAGACTTTTCGTTTTTGCACATTATCCCCTTTTTTACCTCAGTAACATGTATGCAGATGTAAGATA
TGCCAATTTGTAAGGATTTTGATGCAGTTCTTGCATCACTATTTCATGAAATTCTTCATGGTGTGCTA
ATAGGTAAAGTGCAATTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Abbildung 111: Nukleotidsequenz des HQT-Mittelstücks, 3'-Endes (schwarz) und Teilsequenz des 5'-Endes (rot) aus *Glechoma hederacea*

Um Ähnlichkeiten mit den schon bekannten Sequenzen (Sander 2010) aus *Glechoma hederacea* auszuschließen, wurden verschiedene AS-Alignments mit den kurzen/langen HST- und RAS-Sequenzen durchgeführt.

| | | |
|-------|--|-----|
| HQT | -----HTPSVYFYRPDGGAAAADFFDTAVMK | 26 |
| HST-k | MKIEVRDSTLVRPSAATPAVSLWNSNVDLVVPNFHTPSVYFYRPDGGAAAADFFDTAVMK | 60 |
| | ***** | |
| HQT | AALGRALVPFYPMAGRLKRDEDGRVEIDCNAEGVLFVEAESDGSVDDYGDFAPNLELRRL | 86 |
| HST-k | AALGRALVPFYPMAGRLKRDEDGRVEIDCNAEGVLFVEAESDGSVDDYGDFAPNLELRRL | 120 |
| | ***** | |
| HQT | IPAVDYSQGIISTYALLVLQVTKFKCGVSLGVGMQHVVADGFSGLHFINTWSDMARGLDI | 146 |
| HST-k | IPAVDYSQGIISTYALLVLQVTKFKCGVSLGVGMQHVVADGFSGLHFINTWSDMARGLDI | 180 |
| | ***** | |
| HQT | TLPPFIDRTLILLARDPPQPQFKHIEYQPAPAMKTYDA---TETIVSIFKLTREQLTTLK | 202 |
| HST-k | TLPPFIDRTLILLARDPPQPQFKHIEYQPAPAMKTYDA---TETVVSIFKLTREQLTTLK | 236 |
| | ***** : ***** | |
| HQT | AKSKEDGNTVTYSSYEMLAGHVWRCACLARSLPEDQDTKLYIATDGRARLQPPLPQGYFG | 262 |
| HST-k | AKSKEDGNTVTYSSYEMLAGHVWRCACLARSLPEDQDTKLYIATDGRARLQPPLPQGYFG | 296 |
| | ***** | |
| HQT | NVIFTATPLAVAGDLESKPVWYAASKIHDALARMNEYLRSDLYLELQPDALKALVRGAH | 322 |
| HST-k | NVIFTTTPQAVAGDLDSKPVWYAASKIHDALAQMDNEYLRSDLYLELQPDALKALVRGAH | 356 |
| | ***** : * ***** : ***** : ***** | |
| HQT | TFRCPNLGITSWVRLPIHDA DFGWGRPIFMGPGGIAYEGLSFVLPSPANDGSLVAISLQ | 382 |
| HST-k | TFRCPNLGITSWVRLPIHDA DFGWGRPIFMGPGGIAYEGLSFVLPSPANDGSLVAISLQ | 416 |
| | ***** | |
| HQT | AEHMKLFEKLLYDI | 396 |
| HST-k | AEHMKLFEKLLYDI | 430 |
| | ***** | |

Abbildung 112: AS-Alignment der putativen HQT aus *Glechoma* mit der HST-k aus *Glechoma* von Sander (2010), Sternchen (*) zeigen identische AS, Punkte (:) zeigen ähnliche AS

Anhand des AS-Alignments (siehe Abbildung 112) mit der HST-k aus *Glechoma hederacea*, welche von Sander (2010) charakterisiert wurde, ist eine große Ähnlichkeit erkennbar. Leider fehlen zur vollständigen Sequenz noch 34 AS.

Die beiden hochkonservierten Sequenzmotive sind vorhanden: das HxxxD(G)-Motiv, welches den katalytisch aktiven Histidinrest enthält und sich nahe dem katalytischen Zentrum des Enzyms befindet, und das DFGWG-Motiv, das nahe bei dem C-Terminus lokalisiert ist

Auf AS-Ebene konnte eine 91%ige Identität zu der HST aus *Coleus blumei* (FN647681.1) und zu der HCSQT aus *Salvia miltiorrhiza* (EU358958.1) sowie eine 84%ige Identität zu einer HCSQT aus *Coffea canephora* (EF137954.1) festgestellt werden (Stand November 2013).

Das Alignment der putativen HQT mit der, von Sander (2010) isolierten, kurzen HST (siehe Abbildung 113) hat gezeigt, dass es sich hier möglicherweise um eine HSCQT aus *Glechoma hederacea* handeln könnte.

3.4.2 Diskussion zu Untersuchungen der *Glechoma hederacea*-Pflanzen

Um RNA aus Blättern, Blüten, Stängeln und Wurzeln von *Glechoma hederacea* zu extrahieren, wurde die Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) mit der Methode von Giuliano (1993) verglichen. Anhand der Ergebnisse (siehe Kapitel 3.4.1.1.1 und 3.4.1.1.2) wurde gezeigt, dass die erste Methode für die RNA-Extraktion aus *Glechoma hederacea* deutlich geeigneter ist.

Nach der RNA-Extraktion und dem Umschreiben in cDNA wurde für jedes Gen durch Verwendung eines Temperaturgradienten die optimale „Betriebstemperatur“ für die PCR ermittelt (siehe Kapitel 3.4.1.2).

3.4.2.1 Untersuchung diverser „house-keeping“-Gene

Um die Genexpression zu standardisieren, wurden verschiedene house-keeping-Gene untersucht. Es wird die Transkriptionsmenge der zu untersuchenden Gene in Relation zu dem Expressionslevel des verwendeten Standards gesetzt (Thellin et al. 1999). Der ideale Standard sollte innerhalb verschiedener Organe eines Organismus und in allen Entwicklungsstadien zu einem konstanten Level exprimiert werden. Häufig verwendete „house-keeping“-Gene sind z.B. Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) (Nicot et al. 2005; Jain et al. 2006; Reid et al. 2006; Barsalobres-Cavallari et al. 2009; Silveira et al. 2009), EF1 α (Nicot et al. 2005; Jain et al. 2006; Silveira et al. 2009; Setiawan und Lokman 2010; Luo et al. 2012), Cyclophilin (Nicot et al. 2005), Tubulin (Nicot et al. 2005; Jain et al. 2006; Silveira et al. 2009), β -Aktin (Bézier et al. 2002; Langer et al. 2002; Thomas et al. 2003; Olbrich et al. 2008; Lü et al. 2010; Luo et al. 2012), Ubiquitin (Jain et al. 2006; Silveira et al. 2009) und 18S-rRNA (Kim et al. 2003; Burleigh 2001; Gonzalez et al. 2002; Weitzel und Petersen 2010, 2011).

Leider haben zahlreiche Studien gezeigt, dass die Expression verschiedener „house-keeping“-Gene starken Schwankungen unterworfen ist (Nicot et al. 2005; Jain et al. 2006; Reid et al. 2006; Olbrich et al. 2008; Barsalobres-Cavallari et al. 2009; Qi et al. 2010). Dieses Phänomen könnte dadurch erklärt werden, dass die „house-keeping“-Proteine nicht nur im basalen Zellmetabolismus, sondern auch in verschiedenen anderen Bereichen zu finden sind (Thellin et al. 1999). Demzufolge muss empirisch ermittelt werden, welches „house-keeping“-Gen für die jeweilige experimentelle Untersuchung geeignet ist.

3.4.2.1.1 18S-ribosomale RNA (18S-rRNA)

80% der Gesamt-RNA wird durch die ribosomale RNA repräsentiert. Die 18S-rRNA dient zum Aufbau der 40S-Untereinheit der eukaryotischen Ribosomen (Rettschlag 2003; Setiawan und Lokman 2010).

Der Nutzen der 18S- und 28S-ribosomalen RNA als Kontrollgene bei (semi)quantitativen PCR-Reaktionen wird äußerst kontrovers diskutiert. Kim et al. (2003) detektierten 18S-rRNA mithilfe der quantitativen Real-Time-PCR als stabilstes Referenzgen in Reis. Auch Burleigh

(2001) und Gonzalez et al. (2002) nutzten 18S-rRNA zur Standardisierung. Ebenso Stürzenbaum und Kille (2001) attestieren der 18S-rRNA ein hohes „steady-state“-Expressionslevel. Dennoch gibt es zahlreiche Argumente gegen den Einsatz (Nicot et al. 2005). Die ribosomale Untereinheit wird nicht polyadenyliert und folglich auch nicht mit oligo(dT)-Primern durch die Reverse Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben. Besonders aus diesem Grund kann 18S-rRNA nicht als repräsentatives „house-keeping“-Gen angesehen werden (Stürzenbaum und Kille 2001; Nicot et al. 2005). Auch bei *Glechoma hederacea* konnte das Gen mit cDNA, die über oligo(dT)-Primer synthetisiert worden war, nicht amplifiziert werden (siehe Kapitel 3.4.1.3.1; siehe Abbildung 81).

3.4.2.1.2 β -Aktin

β -Aktin-mRNA wird in moderaten Mengen in den meisten Zelltypen gebildet (Bustin 2000). Aktin ist eine Komponente des Cytoskeletts und ist Voraussetzung für diverse zelluläre Vorgänge, wie beispielsweise Änderungen der Zellform, Zellteilung, Phagozytose, Zellbeweglichkeit und die Verteilung von Plasmamembranproteinen (Bustin 2000; Stürzenbaum und Kille 2001; Setiawan und Lokman 2010). In zahlreichen Untersuchungen wurde Aktin als Referenzgen benutzt (Bézier et al. 2002; Langer et al. 2002; Thomas et al. 2003; Olbrich et al. 2008; Lü et al. 2010; Luo et al. 2012). β -Aktin war eines der ersten Referenzgene und wird immer noch als Referenz bei der quantitativen Real-Time-PCR empfohlen (Kreuzer et al. 1999).

Nach dem Alignment aller Lamiaceae-Sequenzen für β -Aktin in der NCBI-Datenbank wurden degenerierte Primer konstruiert (siehe Kapitel 2.3.5.2). Bei der nachfolgenden PCR konnte ein 313 bp langes Fragment in verschiedenen Organen von *Glechoma hederacea* amplifiziert werden (siehe Abbildung 83).

Um die β -Aktin-Expression mit einem anderen Standard zu vergleichen, wurde auch EF1 α untersucht.

3.4.2.1.3 Elongationsfaktor 1 α (EF1 α)

In Eukaryoten enthält der Elongationsfaktor 1 vier verschiedene Untereinheiten (α , β , γ , δ) (Berberich et al. 1995). Die α -Untereinheit (EF1 α) ist in der Lage, einen Komplex mit GTP zu bilden, der dann an die Aminoacyl-tRNA bindet. Der dabei entstehende Tertiärkomplex bindet an das Ribosom, GTP wird zu GDP hydrolysiert und löst sich zusammen mit EF1 α von dem Komplex (Czworkowski und Moore 1996; Setiawan und Lokman 2010). In Pflanzen wird EF1 α grundsätzlich exprimiert, es kann als multifunktionales Protein angesehen werden und macht 5% des löslichen Proteins in eukaryotischen Zellen aus (Durso und Cyr 1994; Suhandono et al. 2001). Jedoch weisen Regionen mit einer hohen Proteinsyntheserate, wie Meristeme, schnell wachsende Organe und sich entwickelnde Gametophyten, einen höheren Gehalt auf (Ursin et al. 1991). Nicot et al. (2005) zeigten in ihren Untersuchungen mit Kartoffeln, dass EF1 α das stabilste „house-keeping“-Gen bei der Applikation von biotischem und abiotischem Stress war.

Für die Untersuchungen an *Glechoma hederacea* wurden EF1 α -Nukleotidsequenzen von *Scutellaria baicalensis*, *Origanum vulgare*, *Plantago major*, *Striga asiatica*, *Avicennia marina*, *Phelipanche racemosa*, *Forsythia x racemosa* und *Salvia officinalis* (alle in die Ordnung Lamiales gehörig) in MultAlign übereinandergelegt und degenerierte Primer entworfen (siehe Abbildung 23).

Außerdem wurde ein direkter Vergleich zwischen den beiden house-keeping-Genen β -Aktin und EF1 α durchgeführt (siehe Abbildung 85), wobei EF1 α die klareren Banden lieferte. Bei beiden Standards fällt die geringere Expression in Wurzeln auf. Um zu überprüfen, ob die geringere Amplifikationsrate auf der Anwesenheit eines Hemmstoffs im Wurzelextrakt beruht, wurde die Wurzel-cDNA in PCR-Reaktionen zu cDNAs aus anderen Organen beigemischt (siehe Abbildung 86). Hierdurch konnte eine Hemmwirkung des Wurzelextrakts ausgeschlossen werden. Ursin et al. (1991) konnten zeigen, dass EF1 α besonders in Regionen mit einer hohen Proteinsynthese wie beispielsweise in Meristemen exprimiert wird.

Zusammenfassend kann man sagen, dass das EF1 α -Gen in *Glechoma hederacea*-Wurzeln geringer exprimiert wird. Möglicherweise liegt in den Wurzeln eine geringere Zellteilungsrate als in den übrigen Organen vor. Um diese Aussage zu bestätigen, müssten noch Untersuchungen mit der quantitativen Real-time-PCR durchgeführt werden.

3.4.2.2 Expression diverser Hydroxycinnamoyltransferasen aus Blättern, Blüten, Stängeln und Wurzeln

Sander (2010) isolierte jeweils zwei cDNA-Sequenzen sowohl für die HST und die RAS als auch für eine unbekannte HCT aus *Glechoma hederacea*. Die beiden RAS-Sequenzen kodieren für zwei unterschiedlich lange Proteine (EMBL accession numbers: HG423394, HG423395). Nur das um 36 AS längere Protein weist die typische RAS-Aktivität auf und überträgt Hydroxyzimtsäurereste von 4-Cumaroyl- oder Caffeoyle-CoA auf 4-Hydroxy- oder 3,4-Dihydroxyphenylmilchsäure, aber nicht auf Shikimi- oder Chinasäure. Die zwei HST-Sequenzen unterscheiden sich in ihrer Länge in nur vier AS (EMBL accession numbers: HG423392, HG423393). In beiden heterolog exprimierten Proteinen konnte die typische HST-Aktivität mit 4-Cumaroyl-/Caffeoyle-CoA und Shikimisäure nachgewiesen werden. Es fand keine Übertragung von Zimtsäureresten auf Chinasäure oder 4-Hydroxyphenylmilchsäure statt. Auch die beiden in ihrer katalytischen Aktivität immer noch unbekannten HCTs unterscheiden sich längenmäßig in vier AS (EMBL accession numbers: HG423396, HG423397). Obwohl viele potentielle Substrate getestet wurden, konnte bis jetzt noch keine spezifische Aktivität festgestellt werden. Beim Vergleich der Genexpression der drei untersuchten Gene wurde festgestellt (siehe Abbildung 87), dass die GhHST am stärksten exprimiert wird. Eine geringfügige Reduktion der Expressionsstärke konnte in den Blüten beobachtet werden. Dies kann durch eine verringerte Lignifizierung erklärt werden. Die längere GhRAS scheint stärker exprimiert zu werden. Diese Beobachtung korreliert mit den Untersuchungen von Sander (2010).

Um eine verlässliche Aussage über die Expression der GhRAS-, GhHST- und GhHCT-Gene in den verschiedenen Pflanzenorganen von *Glechoma hederacea* treffen zu können, müssten die Analysen mit der quantitativen Real-time-PCR wiederholt werden.

3.4.2.3 Gehalt von Chlorogen-, Kaffee- und Rosmarinsäure in Blättern, Blüten, Stängeln und Wurzeln von *Glechoma hederacea*

Nach der ethanolischen Extraktion konnte CA hauptsächlich in den oberirdischen Teilen bestimmt werden. Es lagen in allen oberirdischen Organen ungefähr gleich große Mengen vor, während in Wurzeln fast keine CA gemessen werden konnte (siehe Kapitel 3.4.2.3 und Abbildung 88). Dies korreliert mit den Aussagen vieler Autoren, dass CA auch als UV-Schutz der Pflanzen fungiert (Clé et al. 2008; Comino et al. 2009; Menin et al. 2010). He et al. (2012) konnten auch den höchsten CA-Gehalt (1,08%) in Blättern von *Chrysanthemum indicum* nachweisen. Kaffeesäure konnte in allen untersuchten Organen nachgewiesen werden. Die größte Menge lag in Wurzeln vor. Es ist möglich, dass es sich um ein Abbauprodukt der RA handelt, die in diesem Pflanzenorgan den zweithöchsten Gehalt aufweist. In Blüten konnten RA-Mengen von >12% bestimmt werden. Auch Del Bano et al. (2003) konnte den höchsten Gehalt dieses Sekundärprodukts in Blüten von *Rosmarinus officinalis* (1,6%) feststellen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Expression der GhRAS-Gene nicht mit dem RA-Gehalt korrelieren. Dies kann in der Methode begründet sein, kann aber auch daran liegen, dass die verantwortlichen Gene früher exprimiert als die Sekundärstoffe gebildet werden. Dass dieses Phänomen häufiger auftritt, zeigen die Untersuchungen von Kim et al. (2013), die ebenfalls den höchsten CA-Gehalt in Blüten von *Fagopyrum tartaricum* detektierten, wogegen die Expressionslevel von HQT in allen untersuchten Organen vergleichbar waren. Auch Tuan et al. (2012) maßen den zweithöchsten RA-Gehalt in Wurzeln von *Agastache rugosa*, obwohl die Transkriptionsrate der Biosynthesegene sehr niedrig war.

3.4.2.4 Isolierung der cDNA-/Gensequenz einer Lamiaceae-HQT

Um eine HQT-Sequenz aus *G. hederacea* zu isolieren, wurden HQT-Nukleotidsequenzen von *Solanum lycopersicum*, *Nicotiana tabacum* und *Cynara cardunculus* in dem CLC-Sequence-Viewer zur Identifizierung konservierter Nukleotidbereiche übereinandergelegt (siehe Abbildung 24). Durch Vergleichen mit den bekannten langen und kurzen HST- und RAS-Sequenzen aus *Glechoma* konnten die Unterschiede bestimmt und aus den konservierten Regionen zwei Primer identifiziert werden.

Leider führte diese Strategie nicht zu einem erfolgreichen Ergebnis, und es wurden Primer mithilfe des CODEHOP-Programms designt (siehe Kapitel 3.4.1.6.2). Da auch hier kein positives Resultat erzielt werden konnte, wurden die Primer, die zur Detektion der HCSQT (DQ104740.1) in *Cynara cardunculus* geführt hatten (Comino et al. 2007), verwendet.

Anhand der Referenz-cDNA aus *Nicotiana tabacum* konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem amplifizierten Stück um eine putative HQT handeln könnte. Das Mittelstück (siehe Abbildung 102) und das 3'-Ende (siehe Abbildung 107) konnten erfolgreich sequenziert werden. Die Isolierung des 5'-Endes (siehe Abbildung 111) führte jedoch nicht zu der vollständigen Sequenz.

Ein anderes Protokoll könnte zur Bildung von Vollängen-RNA führen: Zuerst werden die 5'-Phosphatreste der mRNAs mit einer Alkalischen Phosphatase entfernt, wobei die intakten mRNAs durch eine 7-Methylguanosin-Kappe geschützt sind. Als Nächstes wird die Kappe durch die Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAP) entfernt, und ein phosphoryliertes 5'-Ende bleibt zurück. Mit einer T4-Ligase wird ein RNA-Oligonukleotid an das (phosphorylierte) 5'-Ende der mRNA ligiert. Der benötigte RNA-Primer wird durch in-vitro-Transkription eines linearisierten Plasmids hergestellt. Zuletzt wird eine Reverse Transkription mit spezifischen Primern durchgeführt und eine nested PCR mit einem gen- und einem linkerspezifischen Primer angeschlossen (Mülhardt 2009). Außerdem könnten zur Gewinnung des vollständigen 5'-Endes käuflich erhältliche Systeme benutzt werden, die auf dem gleichen Prinzip beruhen.

Ein weiterer Grund der fehlenden Basen wäre z.B., dass mRNAs an ihrem 5'-Ende häufig GC-reiche Sequenzen besitzen, bei denen die Reverse Transkriptase vorzeitig abbricht.

Möglicherweise handelt es sich bei der hier isolierten putativen HQT aus *Glechoma hedereacea* entweder um eine HCSQT oder um die kurze HST-Sequenz, die schon von Sander (2010) isoliert wurde. Die kleinen Unterschiede im Alignment der beiden Sequenzen (siehe Abbildung 112), könnten durch Fehler der TrueStart™ Taq-Polymerase hervorgerufen sein.

Der AS-Sequenzvergleich in der NCBI-Datenbank zeigte eine 91%ige Identität zu einer HCSQT aus *Salvia miltiorrhiza* (EU358958.1) und zu der von Sander (2010) isolierten HST (FN647681.1). Außerdem konnte eine 84%ige Identität zu einer HCSQT aus *Coffea canephora* (EF137954.1) festgestellt werden.

Um völlige Gewissheit zu haben, müsste zuerst die Vollängen-Sequenz bestimmt werden. Im Anschluss sollten Expressionsstudien zur Bestimmung der spezifischen Aktivität erfolgen.

3.5 Projekt 5: Ozonbegasungsexperimente an *Melissa officinalis*

3.5.1 Ergebnisse der Ozonbegasungsexperimente an *Melissa officinalis*

Die Melissenpflanzen wurden für 5 h mit 80 ppb Ozon begast. Proben wurden bei 3, 5, 12 und 24 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode (FBE = „from beginning of exposure“) genommen. Es wurden Änderungen der photosynthetischen Funktionen bestimmt, außerdem wurden ökophysiologische, biochemische und strukturelle Parameter untersucht. Die Begasungsexperimente fanden im April 2012 im Gewächshaus des Departments für Agrikultur, Ernährung und Umwelt der Universität in Pisa statt (siehe Kapitel 2.5.1).

Direkt nach dem Ende der Begasungsperiode (5 h) konnten makroskopisch keinerlei Schäden beobachtet werden. Die ersten kleinen chlorotischen Punkte waren 24 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode zu erkennen (siehe Abbildung 113). Diese Punkte erweiterten sich insgesamt 48 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode zu größeren Läsionen.

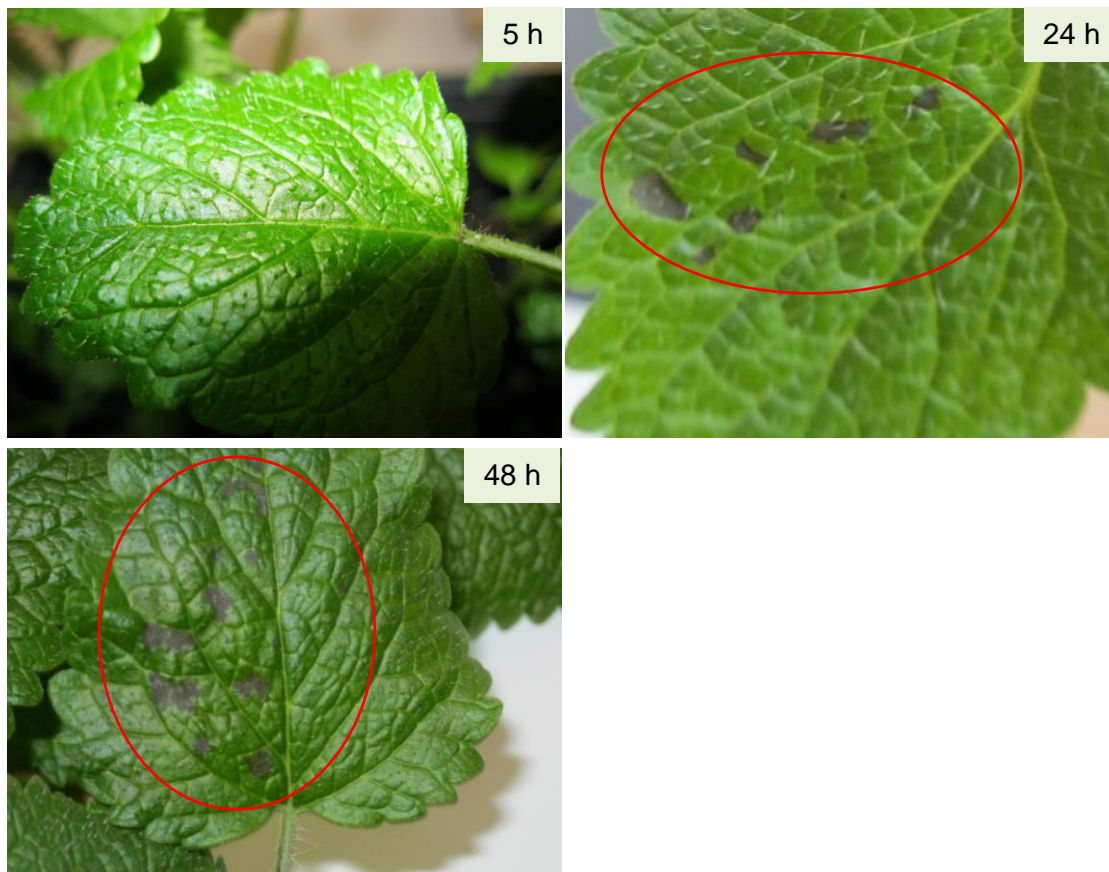


Abbildung 113: Ozonschäden an *Melissa officinalis*-Blättern 5, 24 und 48 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode (80 ppb, 5 h). Nach Ende der Begasungsperiode erhielten die Pflanzen durch einen Aktivkohlefilter gefilterte Luft.

3.5.1.1 Histochemische und cytochemische Untersuchungen

Obwohl die Melissenpflanzen nach Ende der Begasungszeit (5 h) morphologisch vollkommen unbeschadet wirkten, konnten bei mikroskopischer Betrachtung durchaus Schäden festgestellt werden.

3.5.1.1.1 Evansblaufärbung

Mithilfe der Evansblaufärbung können abgestorbene pflanzliche Zellen detektiert werden (siehe Kapitel 2.5.4.2). Es waren bei allen untersuchten Zeitpunkten tote Zellen sichtbar. Größere Areale an abgestorbenen, blauen Zellen fanden sich besonders 3 und 12 h nach Beginn der Ozonbegasung (siehe Abbildung 114).

3.5.1.1.2 H₂O₂-Akkumulation

Es wurden zunächst verschiedene Methoden getestet, um die geeignetste Technik der mikroskopischen H₂O₂-Bestimmung zu definieren.

3.5.1.1.2.1 Methode nach Thordal-Christensen

Nach Thordal-Christensen et al. (1997) inkubierten die Blattstücke in einer DAB-Lösung mit einem pH-Wert von 3,8 für 8 h im Dunkeln (siehe Kapitel 2.5.4.1). Danach wurde das Chlorophyll durch zehnminütiges Kochen mit EtOH entfernt. Beim Mikroskopieren fiel die Lichtundurchlässigkeit der Blattstücke auf, die eine Analyse unmöglich machte. Also wurden die Blattstücke in konzentrierte Chloralhydratlösung (2,5 g/ml) gelegt, um eine Aufhellung zu erzielen. Die Stücke konnten nun problemlos mikroskopiert werden. Die rot-braunen Präzipitationen zeigten eine H₂O₂-Akkumulation an. Die starken Präzipitationen in den Randbereichen rührten von den Verletzungen der Blattstruktur her und waren irrelevant.

3.5.1.1.2.2 Methode nach Iriti

Bei der Methode nach Iriti et al. (2003) wurde der Blattstiel mit dem basalen Blattfragment in ein Becherglas gestellt, in dem sich DAB-Lösung mit einem pH-Wert von 5,6 befand. Die Lösung sollte nur vom Blattstiel aufgenommen werden (siehe Kapitel 2.5.4.1). Diese Methode war jedoch relativ unpraktikabel, da die Blätter immer wieder in die Lösung rutschten und die Konstruktion insgesamt äußerst schlecht hielt. Nach zehnminütigem Kochen mit EtOH konnte jedoch festgestellt werden, dass die Blätter einfach noch zu lichtundurchlässig sind, um eine Präzipitation zu erkennen. Also wurden die Blattstücke wieder in konzentrierte Chloralhydratlösung (2,5 g/ml) gelegt, um sie aufzuhellen.

3.5.1.1.2.3 Methode nach Šnyrychová

Laut Šnyrychová et al. (2009) sollte das Blatt in einer Petrischale, die DAB-Lösung (pH 6-7) enthielt, für 8 h inkubiert werden. Anschließend sollte das Blatt in zwei Hälften geschnitten werden. Die eine Hälfte sollte im Dunkeln belassen, die andere Hälfte sollte mit 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ für 30 min bestrahlt werden. Da die Lampe für photosynthetisch aktive Strahlung (photosynthetically active radiation, PAR) zu dieser Zeit nicht funktionierte, wurde mit dem

dunkel adaptierten Blatt weiter gearbeitet. Auch nach der zehnminütigen Klärung in kochendem Ethanol war die Undurchlässigkeit des Blattes ein Problem. Also wurden die Blattstücke erneut in konzentrierte Chloralhydratlösung (2,5 g/ml) gelegt, um eine Aufhellung zu erreichen.

Da in vorherigen Versuchen auffiel, dass die konzentrierte Chloralhydratlösung eine Aufhellung des Blattes erzielte, wurde diese Beobachtung näher untersucht. Die DAB-Lösung wurde mit einer Pipette abgesaugt und direkt die konzentrierte Chloralhydratlösung dazu gegeben. Die Lösung färbte sich intensiv orangebraun. Es wäre möglich, dass verschiedene Zellbestandteile herausgelöst wurden. Im Mikroskop war erkennbar, dass das Chlorophyll des Blattes nicht angegriffen wurde. Um Alternativen zum konzentrierten Chloralhydrat zu testen, wurden verschiedene andere Lösungsmittel ausprobiert. Nach dem Entfärben des Blattes durch zehnminütiges Kochen mit 96%igem Ethanol wurde Aceton auf die Blattstücke gegeben. Die Lösung färbte sich leicht grünlich, außerdem bildet sich ein weißlicher Niederschlag. Eine negative Beobachtung war, dass die Blätter bei kleinster Berührung brachen. Somit ist die Alternative ungeeignet. Eine weitere Alternative wurde mit der Zugabe von Xylol versucht. Da Xylol jedoch neben den Blättern auch die Petrischale auflöste, wurde auch diese Möglichkeit verworfen. Somit ist die konzentrierte Chloralhydratlösung die beste Möglichkeit, um eine Aufhellung zu erzielen.

3.5.1.1.2.4 Optimierte Methode nach Iriti

Das beste Ergebnis stellte eine Kombination der Methoden von Thordal-Christensen (1997) und Iriti et al. (2003) dar: Nach Einstellen der DAB-Lösung auf einen pH-Wert von 5,6 ließ man drei Blattfragmente in dieser Lösung für 8 h inkubieren. Danach erfolgte das Kochen mit Ethanol und Aufhellen durch Chloralhydrat. Eine verstärkte H_2O_2 -Akkumulation war durch die rot-braunen Präzipitationen sichtbar. Bei allen Zeitpunkten wurden Präzipitationen detektiert. Wie auch bei der Färbung durch Evansblau konnte jedoch besonders 3 und 12 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode eine verstärkte Ansammlung von rot-braunen Niederschlägen festgestellt werden (siehe Abbildung 114).

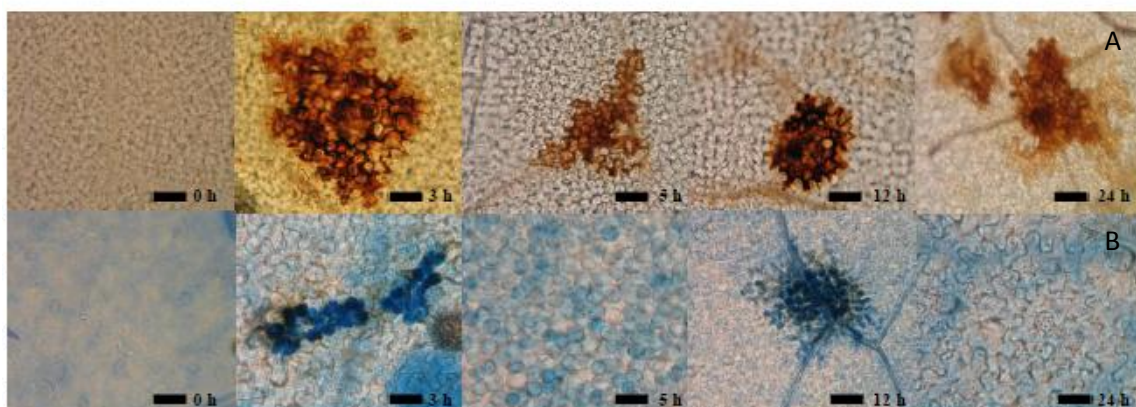


Abbildung 114: Bestimmung der H_2O_2 -Präzipitationen mit der 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Methode (A) und Detektion von abgestorbenen Zellen mit der Evansblaufärbung (B) in *Melissa officinalis*-Blättern nach Ozonbegasung (80 ppb, 5 h). Nach Ende der Begasungsperiode erhielten die Pflanzen durch einen Aktivkohlefilter gefilterte Luft. Zeitpunkte der Probenahmen waren 0, 3, 5, 12 und 24 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode.

3.5.1.2 Biochemische Untersuchungen

3.5.1.2.1 TBARS (thiobarbituric acid reactive substances)-Test

Durch den TBARS-Test nach einer Methode von Hodges et al. (1999) kann das Ausmaß der schädlichen Lipidperoxidation bestimmt werden. Das Lipidperoxidationsprodukt Malondialdehyd reagiert mit zwei Molekülen Thiobarbitursäure und bildet ein rotes Chromophor, welches bei 532 nm absorbiert (siehe Kapitel 2.5.2.1). Schon lange bevor sichtbare Schäden auftraten, waren Membranschäden messbar (siehe Abbildung 115). Es konnte 3 h nach Beginn der Ozonbehandlung ein Anstieg um 93% und nach 5 h um 62% detektiert werden. Auch nach Ende der Ozonbegasungsperiode (5 h) war immer noch ein Anstieg um 58% und um 44% 12 h und 24 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode zu verzeichnen.

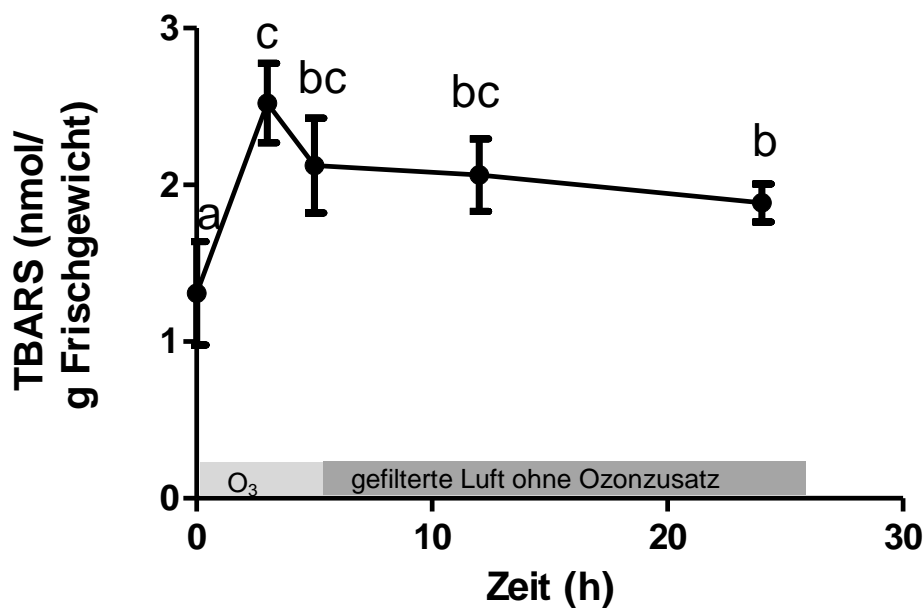


Abbildung 115: TBARS (thiobarbituric acid reactive substances)-Gehalt in *Melissa officinalis*-Blättern nach Ozonbegasung (80 ppb, 5 h). Nach Ende der Begasungsperiode erhielten die Pflanzen durch einen Aktivkohlefilter gefilterte Luft. Zeitpunkte der Probenahmen waren 0, 3, 5, 12 und 24 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode. Die Datenpunkte sind Mittelwerte von drei Proben mit der entsprechenden Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($P \leq 0,05$).

3.5.1.2.2 Abscisinsäuremessungen mittels ELISA

Es wurde ein Sandwich-ELISA mit dem monoklonalen Antikörper DBPA-1 durchgeführt (siehe Kapitel 2.5.6). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den unbegasten Kontrollen und den mit 80 ppb Ozon behandelten Pflanzen festgestellt werden (siehe Abbildung 116). Der ABA-Gehalt wurde somit nicht von Ozon beeinflusst.

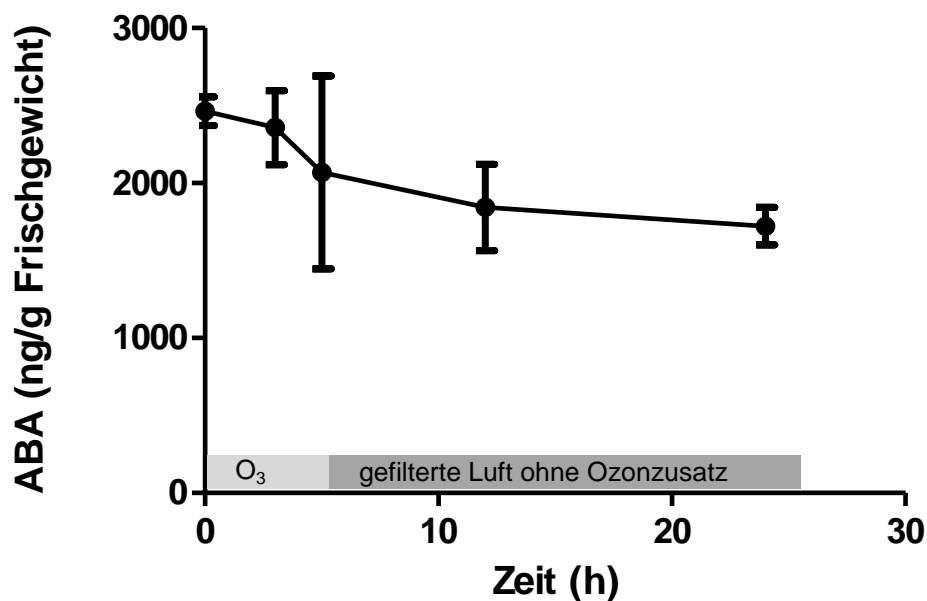


Abbildung 116: ABA (Abscisinsäure)-Gehalt in *Melissa officinalis*-Blättern nach Ozonbegasung (80 ppb, 5 h). Nach Ende der Begasungsperiode erhielten die Pflanzen durch einen Aktivkohlefilter gefilterte Luft. Zeitpunkte der Probenahmen waren 0, 3, 5, 12 und 24 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode. Die Datenpunkte sind Mittelwerte von drei Proben mit der entsprechenden Standardabweichung. Es wurden keine signifikanten Unterschiede gemessen.

3.5.1.2.3 Untersuchungen der photosynthetischen Pigmente

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Veränderungen der Blattpigmente dargestellt. Es konnte ein signifikanter Anstieg an Gesamtchlorophyll festgestellt werden (51%, 44%, 58% 5, 12 und 24 h nach Beginn der Ozonbegasung). Ebenso stieg das Verhältnis von Chlorophyll a zu Chlorophyll b signifikant an (20%, 18% 12 und 24 h nach Beginn der Ozonbegasung). Auch β -Carotin und der Deepoxidationszustand der Carotinoide (DEPS; $[(\text{Antheraxanthin}/2)/(\text{Violaxanthin}+\text{Antheraxanthin}+\text{Zeaxanthin})]\times 1000$) folgten diesem Trend und stiegen in der Periode nach der Ozonbegasung signifikant nach 12 h um 114% (β -Carotin) und nach 24 h um 159% (DEPS) an.

| Zeitpunkte der Probennahme | | | | | |
|--|-------------|---------------|--------------|--------------|--------------|
| | 0 h FBE | 3 h FBE | 5 h FBE | 12 h FBE | 24 h FBE |
| Chl a/b | 1,0±0,09 a | 1,0±0,14 a | 1,1±0,04 ab | 1,2±0,06 b | 1,2±0,100 b |
| Chl a+b (µg/mg Frischgewicht) | 5,7±0,01 a | 6,6±0,29 ab | 8,6±0,86 bc | 8,2±1,77 bc | 9,0±0,38 c |
| β-Carotin (µg/mg Frischgewicht) | 0,54±0,04 a | 0,66±0,086 ab | 0,71±0,08 bc | 1,16±0,208 d | 0,91±0,031 c |
| DEPS (%) | 16±0,6 a | 18±8,00 a | 39±4,78 b | 37±0,4 b | 41±2,62 b |

Tabelle 2: Bestimmung der photosynthetischen Pigmente in *Melissa officinalis*-Blättern nach Ozonbegasung (80 ppb, 5 h). Nach Ende der Begasungsperiode erhielten die Pflanzen durch einen Aktivkohlefilter gefilterte Luft. Zeitpunkte der Probennahmen waren 0, 3, 5, 12 und 24 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode (FBE: from beginning of exposure). Die Datenpunkte sind Mittelwerte von drei Proben mit der entsprechenden Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($P \leq 0,05$). Abkürzungen: Chl a/b: Chlorophyll a/Chlorophyll b-Gehalt, Chl a+b: Chlorophyll a + Chlorophyll b, DEPS: Deepoxidationszustand: $[(\text{Antheraxanthin}/2)/(\text{Violaxanthin}+\text{Antheraxanthin}+\text{Zeaxanthin})] \times 1000$

3.5.1.3 Ökophysiologische Untersuchungen

3.5.1.3.1 Gasaustauschparameter

Über den Gasaustausch bestimmbare Parameter, sind in Abbildung 117 dargestellt. Die Photosyntheseaktivität bei Lichtsättigung (A_{sat}) sank signifikant um 28% am Ende der Begasungsperiode (5 h FBE) und sank 12 und 24 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode weiter um 49% und 55%. Die stomatäre Leitfähigkeit für Wasserdampf (G_w) zeigte einen sehr ähnlichen Verlauf. Auch hier konnte 5 h nach Beginn der Ozonbegasung eine Reduktion um 30% festgestellt werden, die sich auch in der Nichtbegasungsperiode mit Ozon fortsetzte (-46%, -58% 12, 24 h nach Beginn der Ozonbegasung). 24 h nach Beginn der Ozonbegasung konnte ein enormer Anstieg der interzellulären CO_2 -Konzentration (C_i) mit einem Maximum von +90% gemessen werden. Nur nach 3 h konnte bei der unverzögerten Transpirationseffizienz (ITE) kein signifikanter Unterschied analysiert werden. Aber schon 5 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode sank sie um 21% und erreichte ihr Minimum 24 h nach Beginn der Ozonbegasung (-62%, verglichen mit den unbehandelten Kontrollpflanzen).

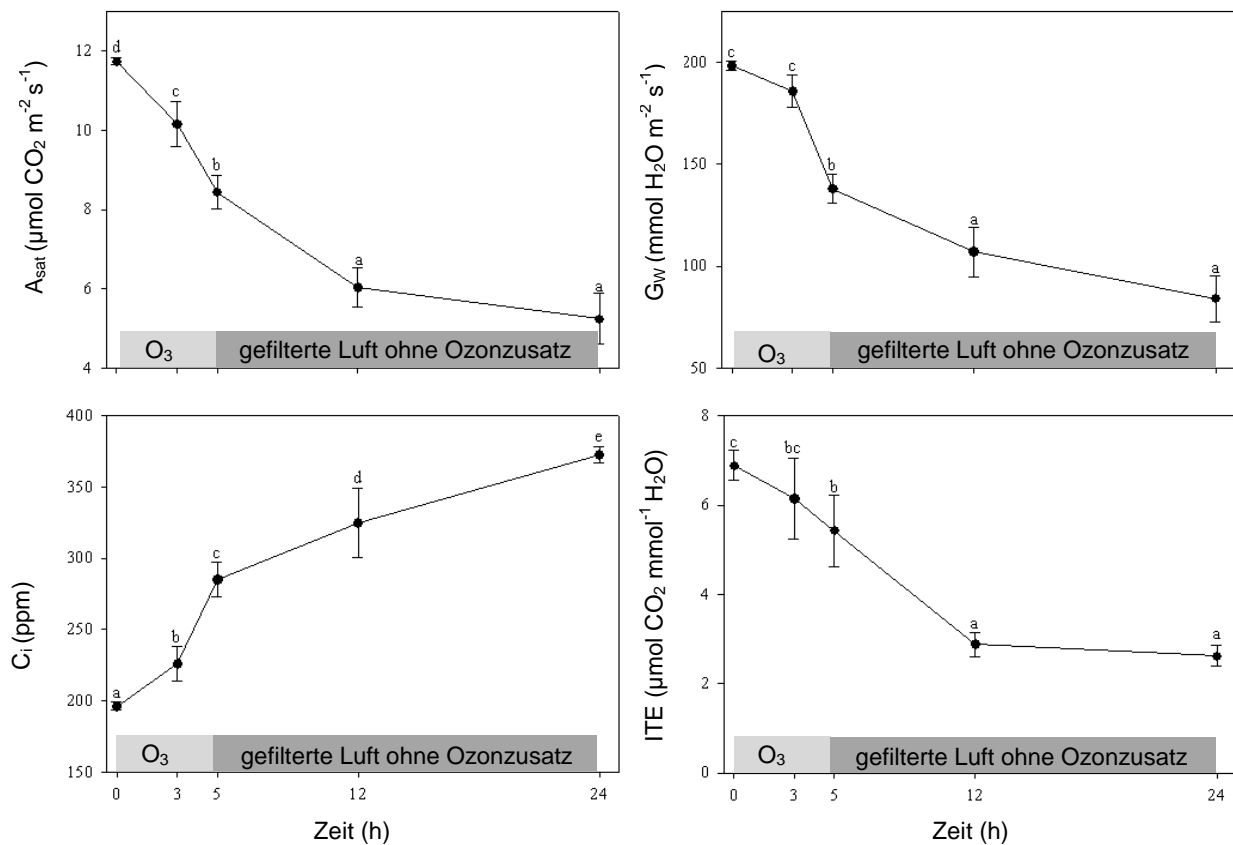


Abbildung 117: Bestimmung der Gasaustauschparameter in *Melissa officinalis*-Blättern nach Ozon-begasung (80 ppb, 5 h). Nach Ende der Begasungsperiode erhielten die Pflanzen durch einen Aktivkohlefilter gefilterte Luft. Zeitpunkte der Probenahmen waren 0, 3, 5, 12 und 24 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode. Die Datenpunkte sind Mittelwerte von drei Proben mit der entsprechenden Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($P \leq 0,05$). Abkürzungen: A_{sat} : Photosyntheseaktivität bei Lichtsättigung, G_w : stomatäre Leitfähigkeit für Wasserdampf, C_i : interzelluläre CO_2 -Konzentration, ITE: instantaneouse transpiration efficiency (unverzögerte Transpirationseffizienz)

Die Gasaustauschparameter (siehe Kapitel 2.5.5.1), die mithilfe der Beziehung der Blatt- CO_2 -Aufnahme (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) zu der interzellulären CO_2 -Konzentration ($C_i < 200 \mu\text{mol mol}^{-1}$) berechnet wurden (A/C_i -Kurve), sind in Tabelle 3 aufgelistet. A_{max} sank signifikant ab 3 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode (-26%) und erreichte ihr Minimum von 74% am Ende der Begasungsperiode (5 h FBE). Sowohl die maximale Carboxylierungsrate der Ribulose-1,5-Bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (V_{cmax}) als auch die maximale Elektronentransportrate zur Regeneration des Ribulose-1,5-bisphosphats (J_{max}) sanken während der Begasungsperiode rapide ab und erreichten beide ein Minimum 24 h nach Beginn der Ozonbegasung (-71%). Zu Beginn der Begasungsperiode (3 h FBE) mit Ozon sanken die Quanteneffizienz (Φ_{CO_2}) und die Triosephosphatverwertung (TPU) signifikant ab und erreichten 5 h nach Beginn der Ozonbegasung beide ein Minimum: -81% (Φ_{CO_2}) und -73% (TPU). Bei der apparenten Quantenausbeute konnten während des gesamten Untersuchungsverlaufs deutlich geringere Werte als bei den unbehandelten Kontrollpflanzen festgestellt werden (-59% 5 h nach Beginn der Ozonbegasung). Die Tagesrespirationsrate

(R_d) sank konstant ab, bis sie ihr Minimum 24 h nach Beginn der Ozonbegasung (-70%) erreichte.

| Zeitpunkte der Probennahme | | | | | |
|--|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | 0 h FBE | 3 h FBE | 5 h FBE | 12 h FBE | 24 h FBE |
| A_{\max} ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) | 12,5 \pm 1,04 d | 9,2 \pm 0,93 c | 3,3 \pm 0,1 a | 4,6 \pm 0,44 b | 4,9 \pm 0,06 b |
| V_{cmax} ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) | 46,1 \pm 8,53 d | 39,6 \pm 2,06 c | 23,5 \pm 0,99 b | 22,3 \pm 0,29 b | 13,3 \pm 2,87 a |
| J_{\max} ($\mu\text{mol Elektronen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) | 20,2 \pm 3,74 d | 17,3 \pm 0,9 c | 10,3 \pm 0,43 b | 9,8 \pm 0,13 b | 5,8 \pm 1,26 a |
| R_d ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) | -4,6 \pm 0,60 a | -6,0 \pm 0,29 b | -6,4 \pm 0,14 b | -6,2 \pm 0,01 b | -7,4 \pm 0,04 c |
| Φ_a | 0,07 \pm 0,002 c | 0,05 \pm 0,001 b | 0,03 \pm 0,001 a | 0,03 \pm 0,004 a | 0,03 \pm 0,004 a |
| Φ_{CO_2} | 0,03 \pm 0,005 c | 0,02 \pm 0,001 b | 0,01 \pm 0,001 a | 0,01 \pm 0,001 a | 0,01 \pm 0,001 a |
| TPU ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) | 4,7 \pm 0,33 c | 3,6 \pm 0,01 b | 1,3 \pm 0,16 a | 1,6 \pm 0,14 a | 1,8 \pm 0,03 a |

Tabelle 3: Bestimmung der Gasaustauschparameter von *Melissa officinalis*-Blättern nach Ozonbegasung (80 ppb, 5 h). Nach Ende der Begasungsperiode erhielten die Pflanzen durch einen Aktivkohlefilter gefilterte Luft. Zeitpunkte der Probennahmen waren 0, 3, 5, 12 und 24 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode (FBE: from beginning of exposure). Die Datenpunkte sind Mittelwerte von drei Proben mit der entsprechenden Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($P \leq 0,05$). Abkürzungen: A_{\max} : maximale Photosyntheseaktivität bei Lichtsättigung, V_{cmax} : maximale Carboxylierungsrate der Ribulose-1,5-Bisphosphat Carboxylase/Oxygenase, J_{\max} : maximale Elektronentransportrate zur Regeneration des Ribulose-1,5-bisphosphats, R_d : Tagesrespirationsrate, Φ_a : apparente Quantenausbeute, Φ_{CO_2} : Quanteneffizienz, TPU: Triosephosphatverwertung

3.5.1.3.2 Chlorophyll a Fluoreszenzparameter

Die Parameter, die aus der Messung der Chlorophyll a Fluoreszenz (siehe Kapitel 2.5.5.2) abgeleitet werden können, sind in Abbildung 118 dargestellt. Alle untersuchten Parameter zeigten nach der Behandlung mit Ozon signifikante Unterschiede. Die Sensitivität für oxidativen Stress kann durch den F_v/F_m -Wert, welcher die maximale Quanteneffizienz des PSII repräsentiert, bestimmt werden (Butler 1978). Die dunkeladaptierten unbehandelten Kontrollpflanzen wiesen einen F_v/F_m -Wert von $0,821 \pm 0,002$ auf, der in dem Bereich liegt, der von Björkman und Demming (1987) für gesunde Pflanzen postuliert wurde ($0,800 \leq F_v/F_m \leq 0,860$). Die mit Ozon begasten Pflanzen zeigten zwar eine Reduktion des F_v/F_m -Werts, doch nur 12 h nach Beginn der Ozonbehandlung konnte ein Wert unterhalb von 0,8 festgestellt werden. Dieses Phänomen war jedoch reversibel, denn 24 h nach Beginn der

Ozonbegasung stieg der Wert wieder auf das Ausgangslevel. Bei näherer Analyse der Fluoreszenzlöschung konnte ein Ansteigen des (1-qP)-Werts (Reduktionsstatus von Q_A) am Ende der Ozon-Behandlungsperiode (5 h FBE) um 6% beobachtet werden. Dieser Trend setzte sich fort und erreichte maximal 13% 12 h nach Beginn der Ozonbegasung. Ein begleitender Anstieg konnte auch beim dem nicht-photochemischen Quenching gemessen werden (+24% 12 h nach Beginn der Ozonbegasung, +13% 24 h nach Beginn der Ozonbegasung). Die aktuelle Quantenausbeute (Φ_{PSII}) sank 5 h nach Beginn der Ozonbegasung um 3% und 7 h später um 7%.

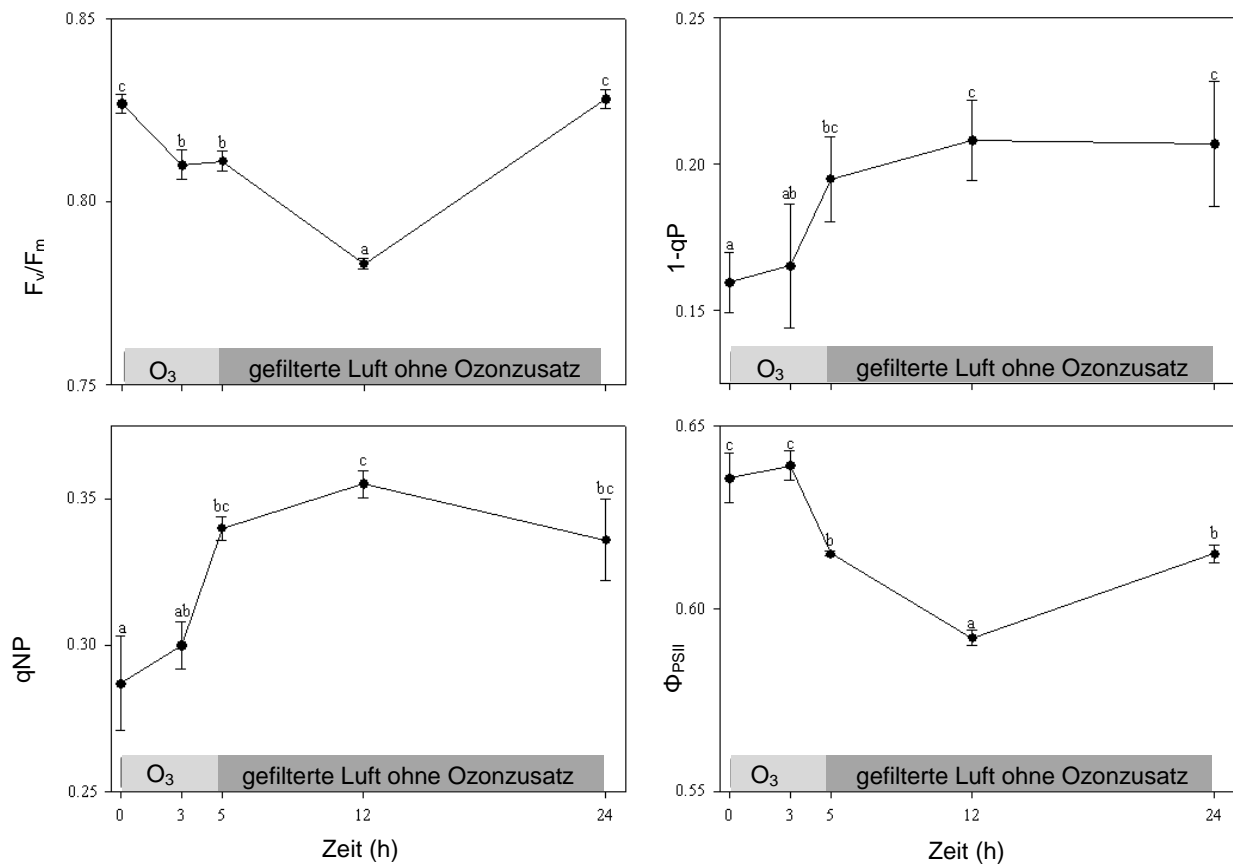


Abbildung 118: Chlorophyll a Fluoreszenz und daraus abgeleitete Parameter von *Melissa officinalis*-Blättern nach Ozonbegasung (80 ppb, 5 h). Nach Ende der Begasungsperiode erhielten die Pflanzen durch einen Aktivkohlefilter gefilterte Luft. Zeitpunkte der Probenahmen waren 0, 3, 5, 12 und 24 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode. Die Datenpunkte sind Mittelwerte von drei Proben mit der entsprechenden Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($P \leq 0,05$). Abkürzungen: F_v/F_m : Verhältnis der variablen zu der maximalen Fluoreszenz, $1-qP$: Reduktionsstatus von Q_A , qNP : nicht-photochemisches „Quenching“, Φ_{PSII} : aktuelle Quantenausbeute von PSII

3.5.1.4 Bestimmung des Rosmarinsäuregehalts

Die Blätter der unbegasten Kontrollpflanzen und der mit Ozon behandelten Pflanzen wurden geerntet und bei -80 °C gelagert. Nach einer Extraktion mit 70% Ethanol wurde der RA-Gehalt bestimmt. Er sank von 9,6% des Blatztrockengewichts um 26% nach 3 h und um 15% nach 5 h. Nach 12 h stieg er wieder auf das Ausgangslevel, um dann 24 h nach Beginn der Ozonbegasung erneut um 28% auf einen Wert von 6,9% zu sinken (siehe Abbildung 119).

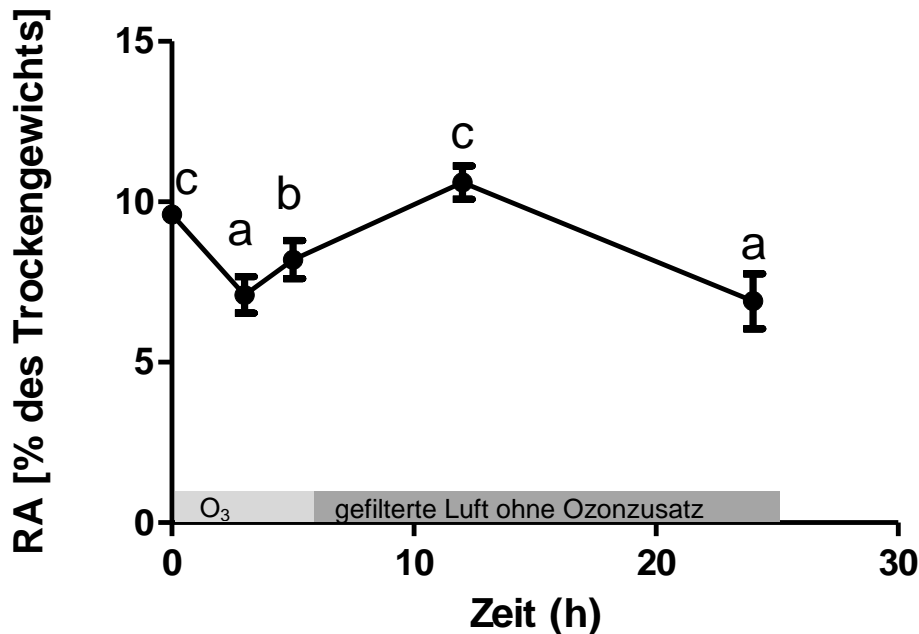


Abbildung 119: Rosmarinsäuregehalt in *Melissa officinalis*-Blättern nach Ozonbegasung (80 ppb, 5 h). Nach Ende der Begasungsperiode erhielten die Pflanzen durch einen Aktivkohlefilter gefilterte Luft. Zeitpunkte der Probennahmen waren 0, 3, 5, 12 und 24 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode. Die Datenpunkte sind Mittelwerte von drei biologischen Proben, die jeweils zweimal gemessen wurden, mit der entsprechenden Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($P \leq 0,05$).

3.5.1.5 PAL- und RAS-Aktivität

Die Bestimmung der Aktivität von PAL und RAS erfolgte, wie in Kapitel 2.4.8.1 und 2.1.14 beschrieben, durch HPLC-Analyse der Reaktionsprodukte (siehe Abbildung 120).

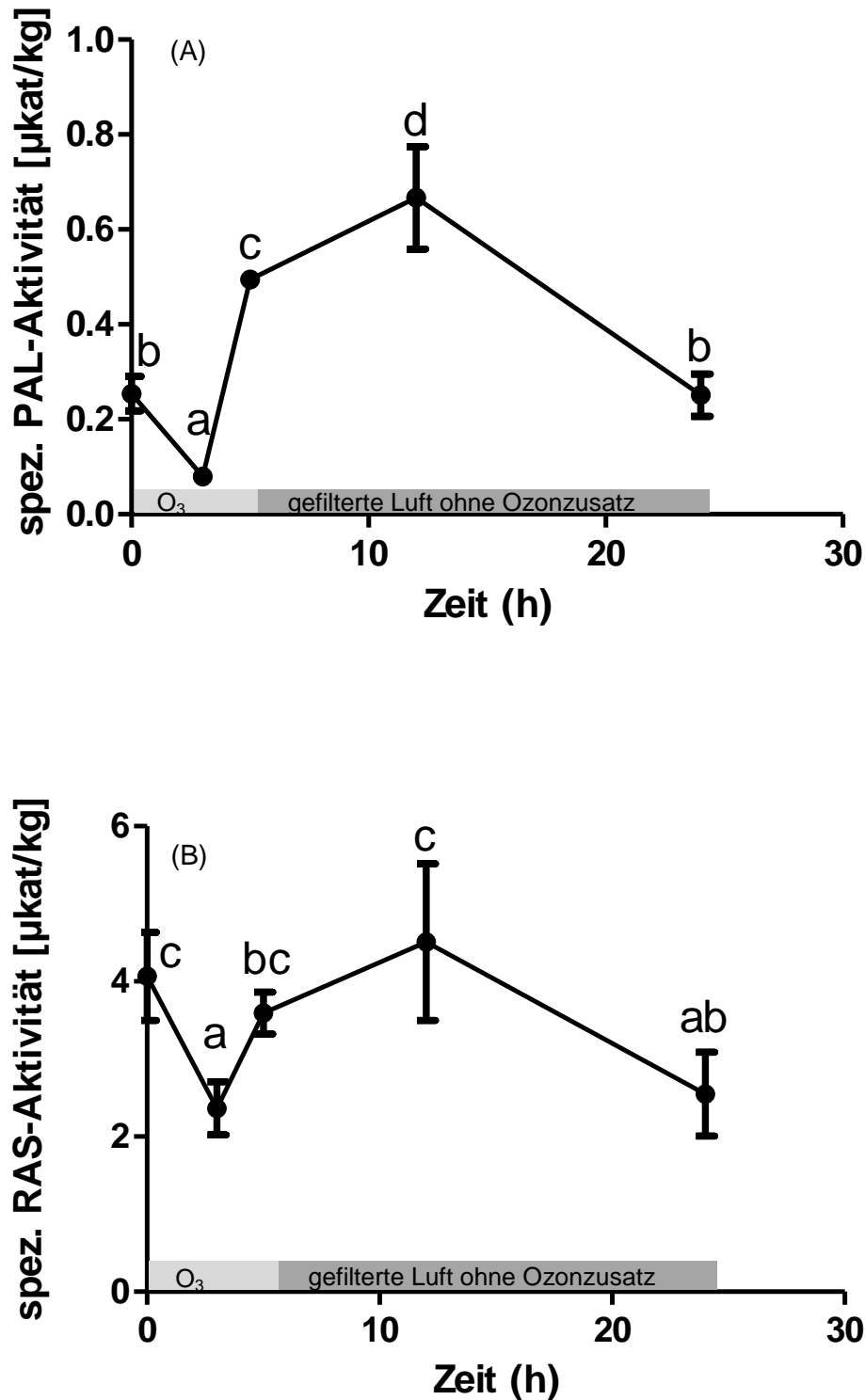


Abbildung 120: Spezifische Aktivität von (A) Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL) und (B) Rosmarinsäuresynthase (RAS) in Proteinextrakten aus *Melissa officinalis*-Blättern nach Ozonbegasung (80 ppb, 5 h). Nach Ende der Begasungsperiode erhielten die Pflanzen durch einen Aktivkohlefilter gefilterte Luft. Zeitpunkte der Probenahmen waren 0, 3, 5, 12 und 24 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode. Die Datenpunkte sind Mittelwerte von drei biologischen Proben mit der entsprechenden Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($P \leq 0,05$).

Nach 3 h Ozonbegasung konnte ein starker Abfall der PAL-Aktivität um 69% von 0,254 $\mu\text{kat/kg}$ auf 0,08 $\mu\text{kat/kg}$ detektiert werden. Nach 5 und 12 h stieg sie hingegen um 95% und um 163%, um am Ende der Untersuchungsperiode wieder auf beinahe den Ausgangswert (0,251 $\mu\text{kat/kg}$) abzusinken (siehe Abbildung 120).

Die spezifische RAS-Aktivität sank von 4,1 $\mu\text{kat/kg}$ vor der Ozon-Begasungsperiode auf 2,4 und 3,6 $\mu\text{kat/kg}$ 3 h (-42%) und 5 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode (-12%). 12 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode konnte ein Anstieg auf das Ausgangslevel beobachtet werden (4,5 $\mu\text{kat/kg}$), jedoch sank die Aktivität 24 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode wieder um 37% auf 2,5 $\mu\text{kat/kg}$ (siehe Abbildung 120).

3.5.1.6 Expressionsanalyse durch semiquantitative PCR

Um den Einfluss von Ozon auf die Expression von Genen des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels und der Rosmarinsäurebiosynthese in *M. officinalis* zu bestimmen, wurden (als Vorversuche) Expressionsanalysen mithilfe der semiquantitativen PCR durchgeführt.

Dazu wurde die aus gefrorenen Blättern isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. Durch die semiquantitative PCR konnten die VL-Sequenzen von von PAL (2130 bp), 4CL (1623 bp), TAT (1236 bp) und RAS (1284 bp) mit spezifischen Primern amplifiziert werden. Als Standard dienten β -Aktin und der Elongationsfaktor EF1 α . Nach dem Anfärben im Ethidiumbromidbad konnten die Gele auf einem Transilluminator visualisiert werden (siehe Abbildung 121).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

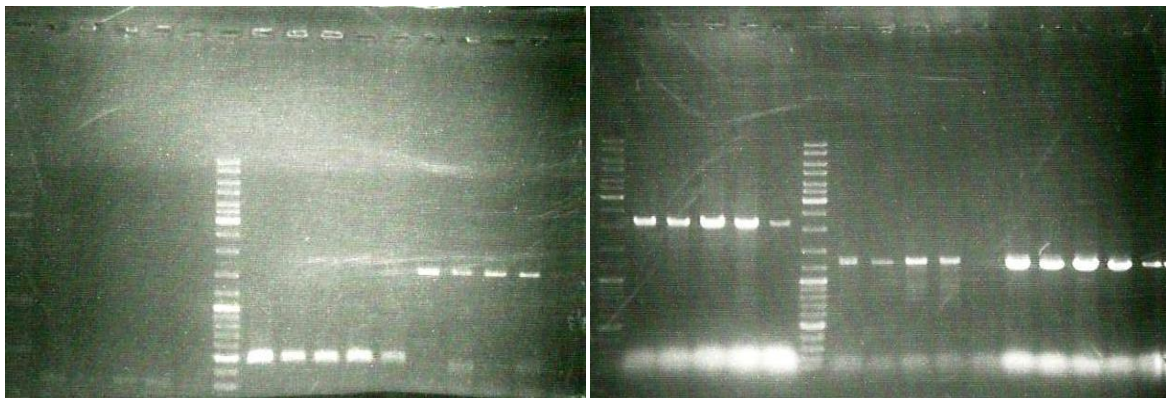


Abbildung 121: Agarosegele zur Expressionsanalyse mit semiquantitativer PCR mit cDNA aus *Melissa officinalis*-Blättern nach Ozonbegasung (80 ppb, 5 h). Nach Ende der Begasungsperiode erhielten die Pflanzen durch einen Aktivkohlefilter gefilterte Luft. Zeitpunkte der Probennahmen waren 0, 3, 5, 12 und 24 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode. **links:** 1: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, β -Aktin: 2: 0 h, 3: 3 h, 4: 5 h, 5: 12 h, 6: 24 h, 7: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, EF1 α : 8: 0 h, 9: 3 h, 10: 5 h, 11: 12 h, 12: 24 h, 4CL: 13: 0 h, 14: 3 h, 15: 5 h, 16: 12 h, 17: 24 h, **rechts:** 1: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, PAL: 2: 0 h, 3: 3 h, 4: 5 h, 5: 12 h, 6: 24 h, 7: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, RAS: 8: 0 h, 9: 3 h, 10: 5 h, 11: 12 h, 12: 24 h, TAT: 13: 0 h, 14: 3 h, 15: 5 h, 16: 12 h, 17: 24 h

Bei allen untersuchten Genen konnte eine leichte Reduktion 3 h und eine starke Reduktion der Expression 24 h nach Beginn der Ozonbegasungsperiode festgestellt werden. Die Expressionslevel der 4CL- und RAS-Gene sowie die der PAL- und TAT-Gene scheinen zu korrelieren. Um eine exaktere Aussagen über die einzelnen Expressionmengen machen zu können, wurde eine Expressionsanalyse mit der quantitativen Real-time-PCR (siehe Abbildung 122) durchgeführt.

3.5.1.7 Expressionsanalyse durch quantitative Real-time PCR

Um den Effekt von oxidativem Stress auf Genebene zu bestimmen, wurden die Expressionslevel von PAL-, 4CL-, TAT- und RAS-Genen in Relation zu den beiden Standards EF1 α und β -Aktin zusätzlich über quantitative Real-time PCR bestimmt.

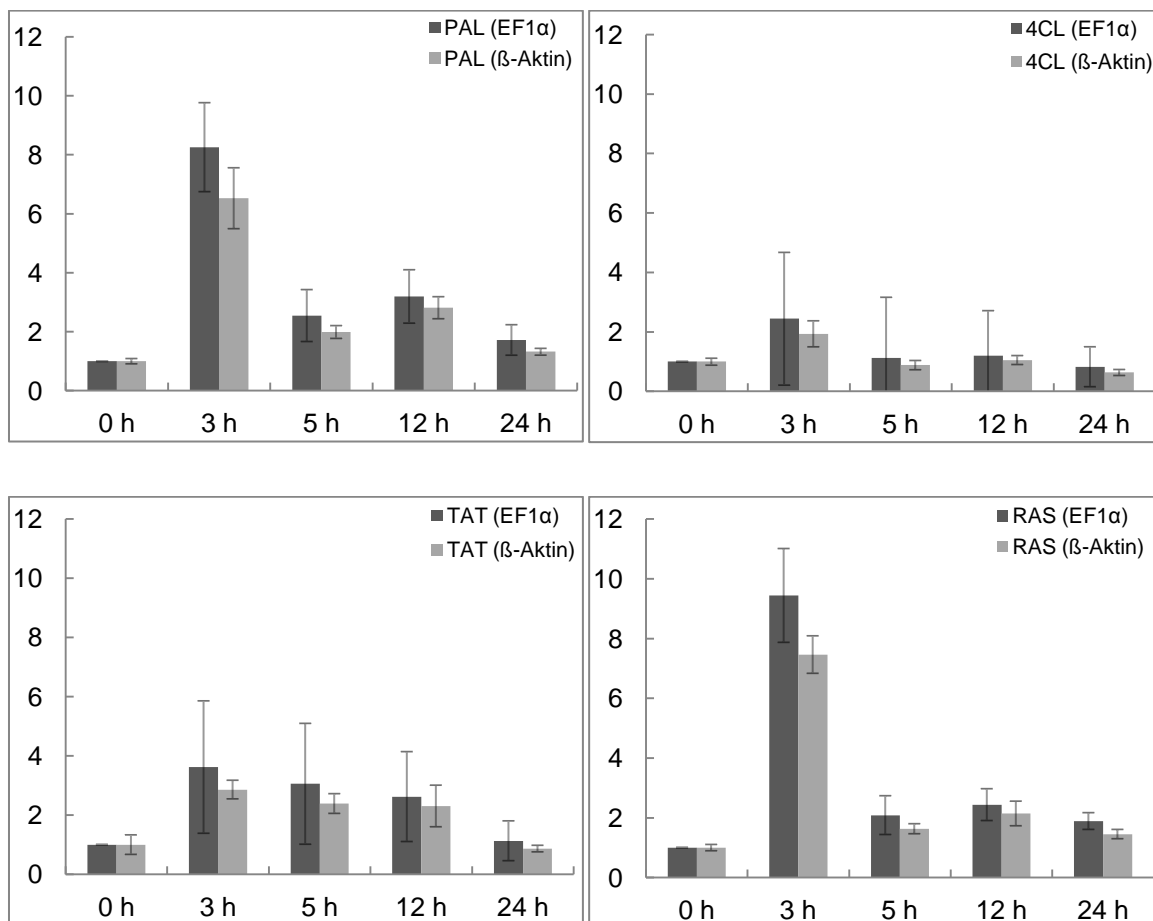


Abbildung 122: Relative Transkriptionslevel der PAL-, 4CL-, TAT- und RAS-Gene in Relation zu den beiden Standards EF1 α und β -Aktin in *Melissa officinalis*-Blättern nach Ozonbegasung (80 ppb, 5 h). Nach Ende der Begasungsperiode erhielten die Pflanzen durch einen Aktivkohlefilter gefilterte Luft. Zeitpunkte der Probenahmen waren 0, 3, 5, 12 und 24 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode. Das Expressionslevel der unbehandelten Kontrollpflanzen wurde auf den Wert: 1,0 gesetzt. Die Datenpunkte sind Mittelwerte von drei Proben mit der entsprechenden Standardabweichung, die durch quantitative Real-time-PCR ermittelt wurden.

Schon nach 3 h Begasung mit Ozon konnte der stärkste Einfluss dieses toxischen Gases auf die Transkriptionslevel gemessen werden. Vor allem die RAS- und PAL-Expression zeigten den größten Anstieg mit 9,4-/7,5- und 8,3-/6,5-fach (bezogen auf EF1 α = 1 bzw. β -Aktin = 1). Der Expressionsanstieg von 4CL und TAT fiel mit 2,4-/1,9- und 3,6-/2,9-fach bezogen auf die house-keeping-Gene deutlich geringer aus. Am Ende der Ozonbegasungsperiode waren alle Gene außer 4CL immer noch leicht induziert. 24 h nach Beginn der Ozonbegasung waren nur noch RAS und PAL geringfügig hochreguliert, während die Expression der übrigen Gene auf das Basalniveau zurücksanken (siehe Abbildung 122).

3.5.1.8 Antioxidative Mechanismen in *Melissa officinalis*

In einem neuen Versuchsansatz im Jahr 2013 wurden Melissenpflanzen unter den gleichen Bedingungen (siehe Kapitel 2.5.1; 2.5.12) wie im vorangegangenen Jahr mit Ozon begast und das Blattmaterial zur Untersuchung antioxidativer Mechanismen genutzt. Im Gegensatz zum vorherigen Jahr wurden zu jedem Probennahmezeitpunkt unbehandelte gleichaltrige Kontrollpflanzen untersucht. Die Zeitpunkte der Probennahmen waren 0, 3, 5, 12, 24 und 48 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode.

3.5.1.8.1 Ascorbat/Dehydroascorbat

Dieser Test beruht auf der Reduktion von Fe³⁺ zu Fe²⁺ durch das Reduktionsmittel Ascorbat. Es bildete sich ein Komplex aus den reduzierten Eisenatomen und den Stickstoffatomen des Bathophenanthrolins (siehe Kapitel 2.5.12.1). Dieser Komplex wurde photometrisch bei 534 nm bestimmt. Bei der Analyse des reduzierten Ascorbats (AsA) wurden bei 3 h und 48 h nach Beginn der Ozonbegasung ein signifikanter Anstieg von 50,5% und 91,5% und bei 12 h nach Beginn der Ozonbegasung eine Verminderung von 26,5% gegenüber den unbehandelten Kontrollen beobachtet. Die oxidierte Form des Ascorbats (DHA) stieg nach 12 h langsam um 8,9% (nicht signifikant) und nach 48 h signifikant um 104,3% auf einen Wert von 3,8 μ mol/g Frischgewicht (Kontrollwert (48 h): 1,9 μ mol/g Frischgewicht) an. Bei der Untersuchung des Gesamtascorbatgehalts (AsA+DHA) fiel nach 3 h eine signifikante Steigerung um 24,8% und nach 48 h um 99,6% auf. Wenn man sich den Redoxstatus von Ascorbat (AsA/AsA+DHA) ansah, fielen ein Anstieg nach 3 h von 18,9% und eine Reduktion nach 12 h um 17,7% auf (siehe Abbildung 123).

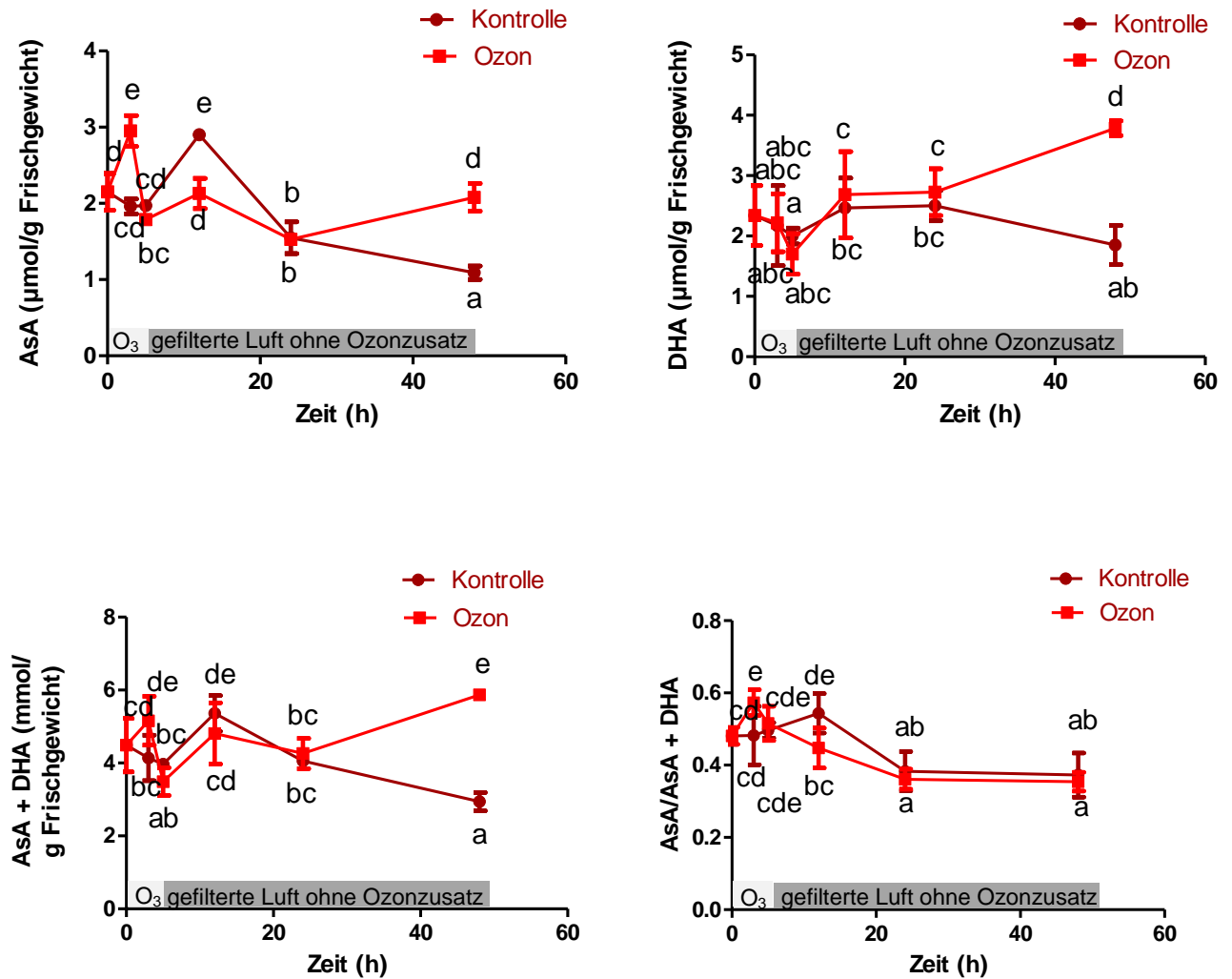


Abbildung 123: Gehalte an Ascorbat (AsA), Dehydroascorbat (DHA) sowie Gesamtascorbat (Asa+DHA) und Redoxstatus von Ascorbat (AsA/Asa+DHA) in *Melissa officinalis*-Blättern nach Ozonbegasung (80 ppb, 5 h). Nach Ende der Begasungsperiode erhielten die Pflanzen durch einen Aktivkohlefilter gefilterte Luft. Zeitpunkte der Probenahmen waren 0, 3, 5, 12, 24 und 48 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode. Unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($P \leq 0,05$). Die Datenpunkte sind Mittelwerte von drei Proben mit der entsprechenden Standardabweichung. Zu jedem Datenpunkt wurden unbehandelte gleichaltrige Kontrollpflanzen, die gefilterter Luft ausgesetzt waren, analysiert.

3.5.1.8.2 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl Radikal (DPPH[•])-Test

Der DPPH[•]-Test ist eine verbreitete Methode, die Radikalfänger-Eigenschaften eines Extrakts zu bestimmen, wobei das DPPH-Radikal durch Polyphenole zum DPPH₂ reduziert wird. Bei einer erhöhten antioxidativen Kapazität sinkt die Absorption, da sich in der Lösung weniger DPPH-Radikale befinden. Die Radikalfänger-Aktivität wird als IC₅₀ (50% inhibition concentration) ausgedrückt. Dieser Wert gibt die Menge an Pflanzenmaterial (in mg) an, die benötigt wird, um 50% der anfänglichen DPPH[•]-Konzentration zu reduzieren (siehe Kapitel 2.5.12.2). 3 und 5 h nach Beginn der Ozonbegasung sank die Radikalfängerkapazität um

11,1% und um 17,7%, nach 12, 24 und 48 h stieg sie um 8%, 25,9% und 27,3% gegenüber den Werten der gleichaltrigen unbehandelten Kontrollpflanzen an (siehe Abbildung 124).

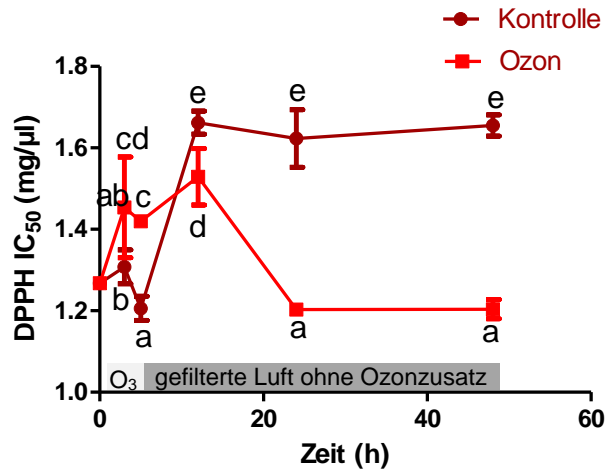


Abbildung 124: DPPH[•]-Test zur Bestimmung der Radikalfängereigenschaften (IC_{50} = Menge an Pflanzenmaterial in mg, um 50% der anfänglichen DPPH[•]-Konzentration zu reduzieren) in *Melissa officinalis*-Blättern nach Ozonbegasung (80 ppb, 5 h). Nach Ende der Begasungsperiode erhielten die Pflanzen durch einen Aktivkohlefilter gefilterte Luft. Zeitpunkte der Probennahmen waren 0, 3, 5, 12, 24 und 48 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode. Unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($P \leq 0,05$). Die Datenpunkte sind Mittelwerte von drei Proben mit der entsprechenden Standardabweichung. Zu jedem Datenpunkt wurden unbehandelte gleichaltrige Kontrollpflanzen, die gefilterter Luft ausgesetzt waren (links), analysiert; verschiedene Färbungen der einzelnen Konzentrationen, die rechte Küvette repräsentiert den Blindwert (rechts).

3.5.1.8.3 H₂O₂-Gehalt

Der H₂O₂-Gehalt wurde mithilfe des Amplex[®] Red-Reagenz bestimmt. Die Menge an vorhandenem H₂O₂ korreliert mit dem gebildeten Produkt Resorufin (siehe Kapitel 2.5.12.3). Wie in Abbildung 125 erkennbar ist, war 24 h nach Beginn der Ozonbegasung die H₂O₂-Menge signifikant um 46,5% (0,006 μmol/mg Frischgewicht im Vergleich zu 0,004 μmol/mg Frischgewicht) erhöht. Ansonsten lagen keine signifikanten Unterschiede vor (siehe Abbildung 125).

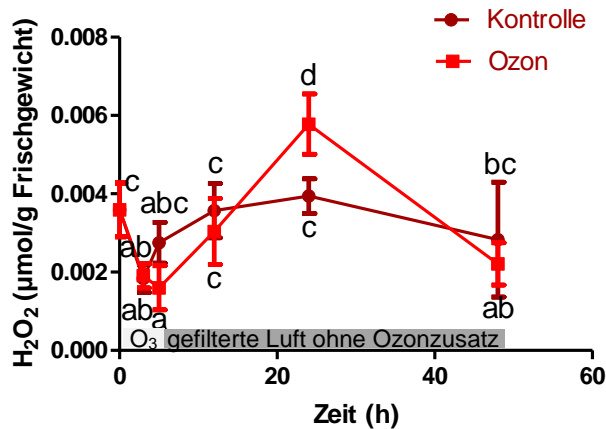


Abbildung 125: Bestimmung des H₂O₂-Gehalts in *Melissa officinalis*-Blättern nach Ozonbegasung (80 ppb, 5 h). Nach Ende der Begasungsperiode erhielten die Pflanzen durch einen Aktivkohlefilter gefilterte Luft. Zeitpunkte der Probenahmen waren 0, 3, 5, 12, 24 und 48 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode. Unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($P \leq 0,05$). Die Datenpunkte sind Mittelwerte von drei Proben mit der entsprechenden Standardabweichung. Zu jedem Datenpunkt existierten unbehandelte gleichaltrige Kontrollpflanzen, die gefilterter Luft ausgesetzt waren.

3.5.1.8.4 Gesamtgehalt phenolischer Verbindungen

Mithilfe des Folin-Ciocalteu-Reagenzes wurde der Gesamtgehalt phenolischer Verbindungen spektroskopisch bei 760 nm bestimmt (siehe Kapitel 2.5.12.4). Der Gehalt wurde mithilfe einer Gallussäure-Kalibriergeraden berechnet. Es war erkennbar, dass der Gesamtgehalt phenolischer Verbindungen nach 5 h signifikant um 31,7% ab- und nach 48 h signifikant um 70,7% zunimmt (siehe Abbildung 126).

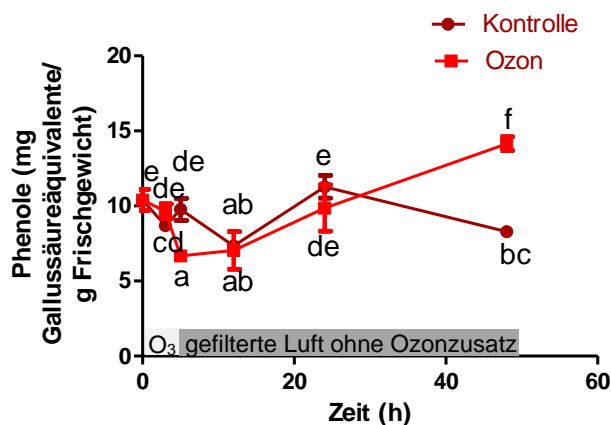


Abbildung 126: Bestimmung des Gehalts an Gesamtphenolen in *Melissa officinalis*-Blättern nach Ozonbegasung (80 ppb, 5 h). Nach Ende der Begasungsperiode erhielten die Pflanzen durch einen Aktivkohlefilter gefilterte Luft. Zeitpunkte der Probenahmen waren 0, 3, 5, 12, 24 und 48 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode. Unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($P \leq 0,05$). Die Datenpunkte sind Mittelwerte von drei Proben mit der entsprechenden Standardabweichung. Zu jedem Datenpunkt existierten unbehandelte gleichaltrige Kontrollpflanzen, die gefilterter Luft ausgesetzt waren.

3.5.1.8.5 Prolin-Gehalt

Der Prolin-Gehalt wurde mithilfe einer angesäuerten Ninhydrinlösung bestimmt. Das rote Chromophor entwickelte sich in der Wärme nach einer Stunde (siehe Kapitel 2.5.12.5). Bei den Melissenblättern konnte 24 h nach Beginn der Ozonbegasung ein Anstieg um 60,7% und nach 48 h um 35,2% (0,081 µg/g Frischgewicht und 0,083 µg/g Frischgewicht) gegenüber gleichaltrigen unbehandelten Kontrollpflanzen (0,05 µg/g Frischgewicht und 0,06 µg/g Frischgewicht) beobachtet werden (siehe Abbildung 127).

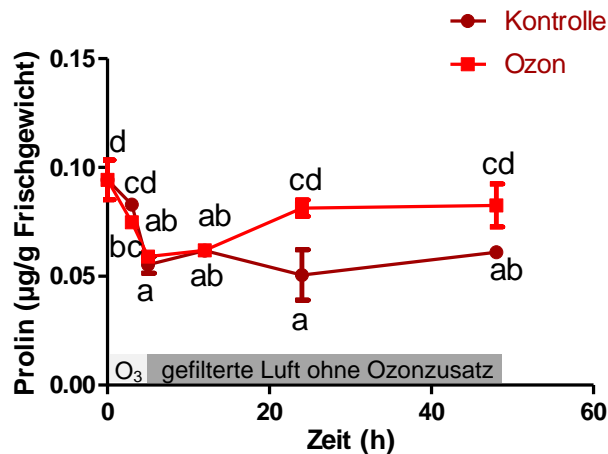


Abbildung 127: Bestimmung des Prolin-Gehalts in *Melissa officinalis*-Blättern nach Ozonbegasung (80 ppb, 5 h). Nach Ende der Begasungsperiode erhielten die Pflanzen (durch einen Aktivkohlefilter) gefilterte Luft. Zeitpunkte der Probennahmen waren bei 0, 3, 5, 12, 24 und 48 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode. Unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($P \leq 0,05$). Die Datenpunkte sind Mittelwerte von drei Proben mit der entsprechenden Standardabweichung. Zu jedem Datenpunkt existierten unbehandelte gleichaltrige Kontrollpflanzen, die gefilterter Luft ausgesetzt waren.

3.5.1.8.6 Bestimmung der Carotinoide

Die Bestimmung der Carotinoide erfolgte durch die Addition der Gehalte von Lutein, β -Carotin, Neoxanthin, Violaxanthin und Antheraxanthin (siehe Kapitel 2.5.3, 2.5.12.6). Es konnte nach 48 h ein signifikanter Anstieg (+110,8%, 6,9 µg/g Frischgewicht) im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle (3,3 µg/g Frischgewicht) festgestellt werden (siehe Abbildung 128).

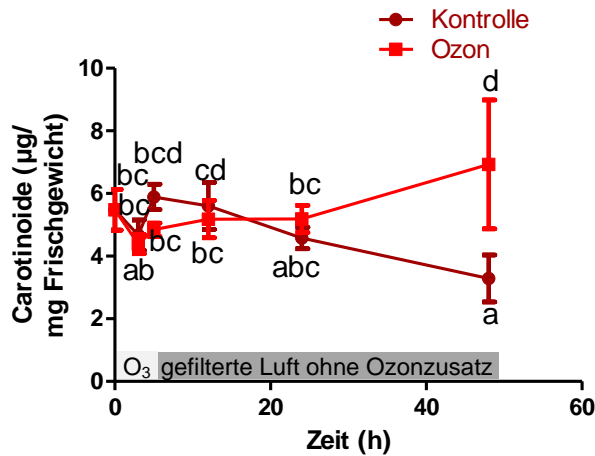


Abbildung 128: Bestimmung des Carotinoid-Gehalts in *Melissa officinalis*-Blättern nach Ozon-begasung (80 ppb, 5 h). Nach Ende der Begasungsperiode erhielten die Pflanzen durch einen Aktivkohlefilter gefilterte Luft. Zeitpunkte der Probennahmen waren 0, 3, 5, 12, 24 und 48 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode. Unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($P \leq 0,05$). Die Datenpunkte sind Mittelwerte von drei Proben mit der entsprechenden Standardabweichung. Zu jedem Datenpunkt existierten unbehandelte gleichaltrige Kontrollpflanzen, die gefilterter Luft ausgesetzt waren.

3.5.1.8.7 Katalase-Aktivität

Um die Aktivität der Katalase festzustellen, gab man 770 µl KP_i -Puffer- H_2O_2 -Mischung in eine Küvette und addierte 30 µl Extrakt. Die Katalase bewirkt eine Spaltung des zugesetzten H_2O_2 (siehe Kapitel 2.5.12.7). Wenn die Absorptionswerte anfangen zu sinken (Verminderung des Wasserstoffperoxids), wurden sie alle 30 s bei 240 nm bestimmt. Nach 5 h FBE konnte ein Anstieg um 211,8% und nach 48 h eine Verminderung um 51,1% gemessen werden (siehe Abbildung 129).

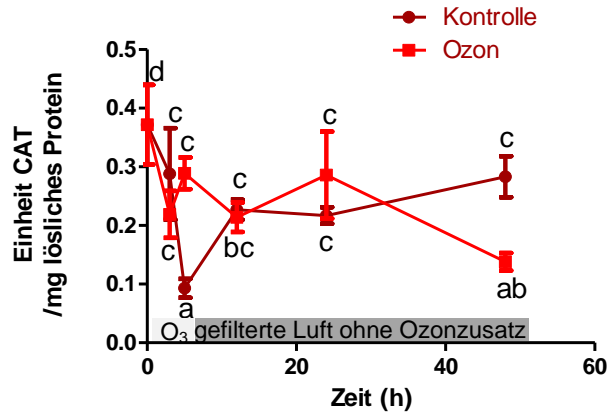


Abbildung 129: Bestimmung der Katalase-Aktivität in *Melissa officinalis*-Blättern nach Ozonbegasung (80 ppb, 5 h). Nach Ende der Begasungsperiode erhielten die Pflanzen durch einen Aktivkohlefilter gefilterte Luft. Zeitpunkte der Probennahmen waren 0, 3, 5, 12, 24 und 48 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode. Unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($P \leq 0,05$). Die Datenpunkte sind Mittelwerte von drei Proben mit der entsprechenden Standardabweichung. Zu jedem Datenpunkt existierten unbehandelte gleichaltrige Kontrollpflanzen, die gefilterter Luft ausgesetzt waren. Eine Einheit ist definiert, als die Menge Enzym, die vonnöten ist, um 1 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ pro Minute bei 25 °C und pH 7 zu spalten.

3.5.2 Diskussion der Ergebnisse der Ozonbegasungsexperimente von *Melissa officinalis*

Es existieren viele Untersuchungen, die sich mit den Effekten von Ozonspitzenkonzentrationen auf Pflanzen beschäftigen, obwohl gezeigt wurde, dass vermehrte Ozon-Hintergrundlevel genauso schädlich sein können (Dawnay und Mills 2009). Die Auswirkungen von Ozon auf verschiedene Kräuter wurden in den vergangenen Jahren eher zurückhaltend analysiert (Davison und Barnes 1998; Madkour und Laurence 2002).

In dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass die Arzneipflanze *Melissa officinalis* sehr empfindlich auf geringe Ozongehalte von 80 ppb über 5 h reagiert.

3.5.2.1 Histochemische und cytochemische Untersuchungen

Auch wenn die Melissenpflanzen am Ende der Begasungsperiode mit Ozon (5 h) morphologisch völlig unbeschadet wirkten (siehe Abbildung 113), konnten mikroskopisch bereits erste Schäden beobachtet werden (siehe Abbildung 114). Die Defizite waren zu jedem untersuchten Zeitpunkt sichtbar, und anhand ihrer Ausbreitung können noch gravierendere Schäden für die darauf folgenden Zeitpunkte vorhergesagt werden. Tote Zellen, die durch die Evansblaufärbung bestimmt wurden, können als Vorläufer weiterer nekrotischer Areale angesehen werden. Auch der histochemische Nachweis der H_2O_2 -Akkumulation (siehe Kapitel 3.5.1.1) zeigte diverse rot-braune Präzipitationen schon 3 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode (siehe Abbildung 115). Die Quantifizierung von Wasserstoffperoxid (Di Baccio et al. 2008) erfolgte in einer späteren Untersuchung mit dem Fluoreszenzmarker Amplex[®] Red Reagenz (siehe Kapitel 3.5.1.8.3). Die Effizienz beider H_2O_2 -Bestimmungen, einen frühzeitigen Ozonschaden zu detektieren, wurde bereits in mehreren Publikationen beschrieben (Iriti et al. 2003; Pasqualini et al. 2003; Faoro und Iriti 2005; Di Baccio et al. 2008). Außerdem wurde im Jahr 2013 die Aktivität der Katalase bestimmt, um den Einfluss des Wasserstoffperoxid-spaltenden Enzyms zu bestimmen (siehe Kapitel 3.5.1.8.7).

3.5.2.2 Biochemische Untersuchungen

3.5.2.2.1 TBARS (thiobarbituric acid reactive substances)-Test

Oxidativer Stress kann in der pflanzlichen Zelle an verschiedenen Punkten angreifen. Das toxische Gas Ozon kann vor allem durch die Stomata in die Zelle eindringen, da die lipophile Kutikula impermeabel ist (Kerstiens und Lenzian 1989; Buchanan et al. 2000). Das starke Oxidationsmittel (Normalpotenzial: +2,07 V) reagiert in hohem Maße mit den mehrfach ungesättigten Fettsäuren der Zellmembran (Pryor und Church 1991; Soldatini et al. 1998; Iriti et al. 2003; Iriti und Faoro 2009). Aufgrund seiner mesomeren Grenzstruktur gilt Ozon als sehr reaktiv und reagiert besonders mit Olefinen (siehe Abbildung 7). Die Ozonierung resultiert in intermediär gebildeten Ozoniden, welche über extrem reaktive „Crige-Zwitterionen“ als Per-

oxide abgebaut werden (Hipelli und Elstner 1996). Auch die vermehrt gebildeten ROS (siehe Kapitel 1.6.4) reagieren mit den Fettsäureresten der Membranphospholipide und steigern die Lipoxygenase-Aktivität (Maccarrone et al. 1997). Die Bildung von MDA (Malondialdehyd) wird durch die Peroxidation der mehrfach ungesättigten Fettsäuren erklärt (Del Rio et al. 2005). Die Daten, die in dem TBARS-Test nach der Begasung von Melissenpflanzen mit Ozon gewonnen wurden, bestätigen das Auftreten von Lipidperoxidationen während der gesamten Begasungsperiode mit Ozon und ebenso in der darauf folgenden Erholungszeit (siehe Abbildung 115). Auch in anderen Untersuchungen konnte ein Anstieg von MDA nach der Begasung mit Ozon detektiert werden (Ciompi et al. 1997; Pellegrini et al. 2011a,b).

3.5.2.2.2 Bestimmung der Abscisinsäure

Abscisinsäure (ABA) ist wahrscheinlich in die Regulation der Stomataöffnung involviert (Li et al. 2000). Bei dem Auftreten von verschiedenen Stressfaktoren (z.B. Ozon) kann die ABA-Konzentration erhöht werden und es resultiert ein Schließen der Stomata, um das Wasser in Blättern zurückzuhalten (Wilkinson et al. 2012).

Es konnte gezeigt werden, dass Ozon die ABA-Werte in einigen Pflanzen (z. B. *Arabidopsis*) erhöht (Overmyer et al. 2008), in anderen Pflanzen die Werte erniedrigt oder überhaupt nicht tangiert, wie z.B. in *Leontodon hispidus* (Wilkinson und Davis 2009). In unseren Untersuchungen konnte trotz des reduzierten stomatären Leitwerts für Wasserdampf (G_w) (siehe Kapitel 3.5.1.3.1) kein Anstieg der ABA-Konzentration detektiert werden (siehe Abbildung 116). Da komplette Blätter analysiert wurden, können jedoch lokale ABA-Anstiege nicht ausgeschlossen werden. Möglicherweise könnten erhöhte ABA-Konzentrationen in den Spaltöffnungsapparaten zu einem Schließen der Stomata führen (Jin et al. 2013). Eine weitere Erklärung wäre ein Einfluss von Ozon auf das Plasmamembranprotein SLAC1 (slow anion channel-associated 1), welches zu einem Schließen der Stomata führt (Vahisalu et al. 2008).

3.5.2.2.3 Photosynthetische Pigmente

Es konnte ein signifikanter Anstieg des Verhältnisses von Chlorophyll a zu Chlorophyll b und des Gesamtchlorophylls gemessen werden. Zudem stiegen signifikant die β -Carotingehalte sowie der Deepoxidationszustand der Carotinoide (DEPS, siehe Tabelle 2) an. DEPS ist definiert als $[(\text{Antheraxanthin}/2)/(\text{Violaxanthin}+\text{Antheraxanthin}+\text{Zeaxanthin})] \times 1000$ und repräsentiert den Dissipationsprozess als Hitze, um den photosynthetischen Apparat zu schützen (Scebba et al. 2003; siehe Kapitel 1.6.2; 2.5.3; Abbildungen 10 und 11). Der Anstieg des DEPS ist möglicherweise durch eine Reduktion der Lichtsammelkomplexe zu erklären. Durch den Ozonschaden werden nicht nur der Xanthophyllzyklus, der ein äußerst effektiver Mechanismus ist, um überschüssige Energie abzubauen (Demmig-Adams und Adams 1996), sondern auch das antioxidative System aktiviert. Diese Hypothese wird durch ein Ansteigen des β -Carotins bestätigt. Verschiedene Studien haben einen Abbau von photosynthetischen Pigmenten (Chlorophyll a und b) durch langfristig vorhandenes Ozon gezeigt, doch eine akute Ozonapplikation mag unzureichend sein, um eine Veränderung herbeizuführen. In unseren Analysen war der Gehalt an Photosynthesepigmenten in behandelten

Pflanzen höher als in den gleichaltrigen unbehandelten Kontrollpflanzen. Es könnte sich um einen Kompensations- oder Regenerationsmechanismus der Pflanzen handeln (Pääkkönen et al. 1998; Sakalauskaite et al. 2010). Ein Ansteigen des Gesamtchlorophylls und des Carotinoidgehalts wurde ebenfalls nach der Begasung von *Phaseolus vulgaris* bei Ozonkonzentrationen von 40 n/l und 80 n/l in den ersten Blättern beobachtet (Leitao et al. 2008).

3.5.2.3 Ökophysiologische Untersuchungen

3.5.2.3.1 Gasaustauschparameter

Es ist immer noch nicht geklärt, ob die Effekte von Ozon auf die Photosyntheseprozesse durch einen direkten oxidativen Schaden an den Chloroplasten oder durch ein Signal, welches außerhalb der Chloroplasten produziert wird, ausgelöst werden (Wohlgemuth et al. 2002).

Bei den Untersuchungen der Melissenblätter sank die CO_2 -Assimilationsrate signifikant während der gesamten Begasungsperiode mit Ozon und ebenso in der Erholungsphase ab. Dieser Abfall korrelierte mit einer starken Reduktion der stomatären Leitfähigkeit und der ITE (unverzögerte Transpirationseffizienz), sowie einem Ansteigen der interzellulären CO_2 -Konzentration (Abbildung 117; Onandia et al. 2011). Eine reduzierte stomatäre Leitfähigkeit mit einem erhöhten interzellulären CO_2 -Gehalt scheint den Ozonfluss in die Pflanze zu hemmen (Allen 1990; Sitch et al. 2007). Die starke Reduktion der photosynthetischen Aktivität und der Anstieg der interzellulären CO_2 -Konzentration in *Melissa officinalis* sprechen für eine reduzierte Carboxylierungseffizienz durch die Enzyme des Calvin-Zyklus als Reaktion auf die Begasungsexperimente mit Ozon (Di Baccio et al. 2008). Die Verminderung der photosynthetischen Kapazität korreliert wahrscheinlich mit einer Verlangsamung der Dunkelreaktionen im Calvin-Zyklus, die auf einer Reduktion der RuBisCO-Aktivität beruht (Pellegrini et al. 2011a).

Das starke Absinken der V_{cmax} (maximale Carboxylierungsrate der RuBisCO), der J_{max} (maximale Elektronentransportrate zur Regeneration des Ribulose-1,5-bisphosphats), der Φ_{CO_2} (Quanteneffizienz) und der TPU (Triosephosphatverwertung) in unseren Untersuchungen (siehe Tabelle 3) könnte durch eine Hemmung der RuBisCO sowie der Reduktion der Carboxylierungseffizienz, eine geringeren Kapazität der Regeneration des CO_2 -Akzeptors als auch durch eine Verminderung des Transports photosynthetischer Produkte erklärt werden (Guidi et al. 2001; Noormets et al. 2001; Pellegrini et al. 2011a). Diese Reduktionen führen zu einer Beeinträchtigung der CO_2 -Assimilation. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Biswas und Jiang (2011) überein, die beschrieben, dass die durch Ozon induzierte Abnahme der Photosyntheseaktivität in Winterweizen durch enzymatische und stomatäre Reduktionen hervorgerufen sein könnte. Die Abnahme der RuBisCO-Aktivität kann einen Einfluss auf verschiedene Mechanismen, wie z.B. die Hemmung der Proteinbiosynthese oder eine direkte Fragmentierung durch ROS haben (Degl'Innocenti et al. 2003).

Die Analyse der Lichtantwortkurve bei unseren Messungen zeigte, dass eine Reduktion der apparenten Quantenausbeute (Φ_a) während der gesamten Untersuchungsperiode gemessen wurde. Dies korreliert mit den anderen Gasaustauschparametern und verdeutlicht, dass Ozon die photochemischen Reaktionen des PSII und/oder PSI beeinflusst und sich z.B. in einer reduzierten RuBisCO-Aktivität zeigt (Pell und Pearson 1982; Reich 1983).

3.5.2.3.2 Chlorophyll a Fluoreszenzparameter

In den mit Ozon begasten Pflanzen konnte nach 12 h eine signifikante Reduktion der allgemeinen Quantenausbeute der Photosynthese (F_v/F_m) gemessen werden (siehe Abbildung 118). Dies legt nahe, dass die Reduktion der CO_2 -Assimilationsrate nicht an Veränderungen der maximalen Effizienz des PSII gekoppelt ist, was auch in anderen Untersuchungen beobachtet wurde (Feng et al. 2006; Pellegrini et al. 2011b). Der Anstieg von $(1-qP)$, der den Reduktionsstatus von Q_A repräsentiert, legt die Vermutung nahe, dass die Enzyme des Calvin-Zyklus ein primäres Ziel von Ozon darstellen (Bortier et al. 2000). Der $(1-qP)$ -Wert ist ein verlässlicher Indikator für den Reduktionsstatus von Q_A (Plastochinon A). Nach der Abgabe eines Elektrons an Q_B erfolgt eine Reoxidation des vorher reduzierten Plastosemichinons zum Plastochinon Q_A (Buchanan et al. 2000). Eine Erhöhung des $(1-qP)$ -Werts in unseren Untersuchungen weist auf eine weniger effektive Reoxidation dieses Elektronenakzeptors hin (Pellegrini et al. 2011a). Durch die Reduktion der RuBisCO-Aktivität werden weniger ATP und NADPH benötigt. Dies führt zu einer Hemmung der PSII Reaktionszentren und demzufolge zu einer Änderung des Elektronentransports von PSII zu PSI. Diese Hypothese stützt sich auf die Reduktion der Quantenausbeute des PSII (Φ_{PSII}), die mit dem Elektronentransport korreliert (Buchanan et al. 2000). Die Vermutung liegt nahe, dass die überschüssige Energie als Hitze abgegeben wurde, um den Photosyntheseapparat nicht weiter zu schädigen. Diese Annahme stützt sich auf den Anstieg des nicht-photochemischen „Quenching“ (siehe Kapitel 1.6.2), welches während und nach der Begasungsperiode mit Ozon stark anstieg (siehe Abbildung 118). Ähnliche Ergebnisse wurden bei den Untersuchungen an *Lamottea diana*e nach chronischer Ozonexposition erzielt (Calatayud et al. 2011).

Zusätzlich zu den Untersuchungen der photosynthetischen und histochemischen Parameter sollte der Einfluss von geringen Ozonkonzentrationen auf den Sekundärstoffwechsel in *Melissa officinalis* bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden der RA-Gehalt, die Aktivität der Enzyme PAL und RAS und die Transkriptionsmenge der PAL-, 4CL, TAT- und RAS-Gene (siehe Abbildung 5) in unbehandelten Kontrollpflanzen und in den mit Ozon begasten Pflanzen untersucht.

3.5.2.4 Einfluss auf den Sekundärstoffwechsel

Nach einer signifikanten Reduktion des RA-Gehalts der Melissenblätter 3 und 5 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode, stieg der Wert nach 12 h wieder auf den Ausgangswert, um dann nach 24 h erneut zu fallen (siehe Abbildung 119). Möglicherweise oxidiert Ozon die RA (Strukturformel: Abbildung 5), denn es weist ein sehr hohes Redoxpotenzial von +2,07 V auf (Iriti et al. 2003). Des Weiteren beeinflusst dieses toxische Gas beispielsweise auch den Tonoplasten (Biomembran, die die Zentralvakuole vom Cytoplasma trennt) und zerstört Zellkompartimente (Oksanen et al. 2001; Asensi-Fabando et al. 2010). Da die RA in der Vakuole lokalisiert ist (Häusler et al. 1993), würde eine Destabilisierung des Tonoplasten in einer Oxidation und /oder einem Abbau der RA münden. Auch Fletcher et al. (2005) konnten nach dem Behandeln von *Mentha spicata* L. mit Hitzestress eine Reduktion der RA beobachten.

Eine kürzlich durchgeführte Studie untersuchte die Reaktionen des Phenylpropanoid- und Ligninstoffwechselwegs auf Ozonbegasung in den Blättern und der Rinde von *Populus tremulaxalba*. Es konnte ein starker Anstieg der spezifischen PAL-Aktivität nach 10 Tagen durch Ozon-Begasung mit 200±20 ppb über einen Zeitraum von 60 Tagen beobachtet werden (Richet et al. 2012).

Sowohl die spezifischen Aktivitäten der PAL als auch der RAS korrelierten mit dem RA-Gehalt in den Melissenblättern. Alle drei Werte fielen nach 3 h und stiegen während der darauf folgenden Zeitpunkte an (siehe Abbildungen 119 und 120). 12 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode waren sowohl der RA- als auch der RAS-Wert geringfügig, aber nicht signifikant höher als der Ausgangswert. Dies stand im Kontrast zu dem PAL-Wert, der einen signifikanten Unterschied von +163% zu dem Ausgangswert aufwies. PAL ist ein Enzym, welches den Primär- mit dem Sekundärstoffwechsel verknüpft (Dixon und Pavia 1995) und häufig nach Applikation von abiotischem und biotischem Stress hochreguliert wird (Pasqualini et al. 2012). Biagioni et al. (1997) konnten einen zwölffachen Anstieg der spezifischen PAL-Enzymaktivität in Tabak, Bohne und Espe nach 24 h Ozonbegasung (4 h - 80 ppb, 4h - 120 ppb, 5h – 150 ppb) bestimmen.

Kremer und Howell (1974) analysierten die Blätter von *Phaseolus vulgaris* nach Ozonbegasung (80-100 ppb, 5 h) und maßen 96 h nach Ende der Begasungszeit einen maximalen PAL-Anstieg (+170%). Auch Eckey-Kaltenbach et al. (1994) beobachteten einen starken Anstieg der spezifischen PAL-Aktivität nach 10 h Begasung mit Ozon (25 µkat/kg bei 150 n/l and ~ 27 µkat/kg bei 200 n/l O₃) und ein Absinken auf den Ausgangszustand nach 24 h bei *Petroselinum crispum*. Auch konnte eine erhöhte PAL-Aktivität gemessen werden, nachdem *Centaurea jacea*-Pflanzen 200 ppb Ozon für 5 h ausgesetzt waren (Francini et al. 2008). Di Baccio et al. (2008) zeigten, dass eine erhöhte Toleranz gegenüber Ozon (60 n/l, 15 Tage, 5 h pro Tag) mit einer verstärkten spezifischen PAL-Aktivität einhergeht. Dennoch existieren auch Untersuchungen, die ein Absinken der PAL beschreiben. Rao et al. (1995) schilderten, dass Ozon einen oxidativen Schaden an Proteinen hervorrufen kann. Dies könnte ein möglicher Grund für das rasche Absinken der PAL in Melisse nach dreistündiger Ozonbegasung sein (siehe Abbildung 120 (A)).

3.5.2.5 Expressionsanalysen durch semiquantitative PCR und quantitative Real-time PCR

Ozon kann neben anderen Prozessen auch die Transkription verschiedener Gene beeinflussen (Pasqualini et al. 2012). Es sollten immer zwei verschiedene „house-keeping“-Gene als Standard verwendet werden, da nur so mögliche Fehler ausgeglichen werden können (Thellin et al. 1999; Vandesompele et al. 2002). Nicot et al. (2005) detektierten EF1 α als stabilstes Gen bei der Behandlung von Kartoffeln mit abiotischem Stress, während Olbrich et al. (2008) schilderten, dass β -Aktin das einzige „house-keeping“-Gen war, das von abiotischem Stress in *Fagus sylvatica* nicht tangiert wurde.

Aus diesem Grund wurden in den Untersuchungen an Melisse die beiden Referenzgene β -Aktin und EF1 α gewählt. Die starke Verminderung der Expressionslevel bei allen Genen der RA-Biosynthese und außerdem bei den beiden „house-keeping“-Genen in der semiquantitativen PCR 24 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode korrelierte mit dem Auftreten von makroskopischen Schäden (siehe Abbildung 114 und 121). Dies kann durch den fortschreitenden Zelltod nach der Ozonbegasung erklärt werden. Denslow et al. (2007) konnten einen ähnlichen Trend in der Transkriptionsregulation einiger Gene der Vitamin B₆-Biosynthese nach dem Begasen von *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen mit geringen Ozon-Konzentrationen (125 ppb, 8 h pro Tag) feststellen. Um die Transkriptionslevel der untersuchten Gene (PAL, 4CL, TAT und RAS) noch genauer zu bestimmen, wurde eine quantitative Real-time-PCR durchgeführt (siehe Abbildung 122). Die Ergebnisse korrelierten mit dem RA-Gehalt und den PAL- und RAS-Aktivitäten (siehe Abbildung 119 und 120). Nach einem Absinken der oben genannten Parameter wurden die entsprechenden Gene unverzüglich induziert, was in einem Ansteigen der PAL- und RAS-Aktivitäten und ebenso des RA-Gehalts resultierte. Auch Sharma und Davis (1994) konnten ein rasches Hochregulieren der PAL-mRNA (dreifacher Anstieg) nach 3 h Ozonbegasung (300 ppb) an *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen messen. Die vermehrte Synthese an Phenylpropanoiden könnte einen Schutz- bzw. Kompensationsmechanismus der Pflanzen gegenüber Ozon repräsentieren. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten Eckey-Kaltenbach et al. (1994) nach Ozonbegasung von *Petroselinum crispum*. Die Transkriptionslevel sowohl von PAL- als auch von 4CL-Genen stiegen nach sechs Stunden circa um das Zehnfache an. Ozon wird auch als „cross-inducer“ bezeichnet, da er unterschiedliche Verteidigungswege simultan aktiviert (Eckey-Kaltenbach et al. 1994). Biotischer und abiotischer Stress führt beispielsweise zu einem Anstieg der spezifischen Aktivität von PAL, und die de-novo Synthese scheint mit einem Anstieg der PAL-mRNA-Level zu korrelieren (Chappel und Hahlbrock 1984).

3.5.2.6 Diskussion der antioxidativen Mechanismen in *Melissa officinalis*

Das aerobe Leben entstand vor ca. 2-3 Billionen Jahren, als die Vorläufer von Cyanobakterien das PSII entwickelten und für die biosynthetischen Reaktionen Wasser als Reduktionsmittel nutzten, das ja im Übermaß vorhanden war. Der photosynthetische Metabolismus schuf einen dramatischen Wechsel in der Atmosphäre, da die Konzentration des „Abfallprodukts“ Sauerstoff (O_2) enorm anstieg. Dies erzeugte wiederum eine evolutionäre Nische für neue Organismen, die sich an die sauerstoffreiche Umgebung adaptieren konnten. Die Nutzung von O_2 hatte diverse Vorteile, da sich eine Vielzahl metabolischer Reaktionen, gegenüber dem Metabolismus von anaeroben Organismen, entfalten konnten. Es wird geschätzt, dass ca. 1000 Stoffwechselreaktionen O_2 nutzen und aerob-spezifisch sind (Falkowski 2006; Halliwell 2006; Raymond und Segre 2006). Doch der evolutionäre Gewinn barg auch ein hohes Risiko, denn das Molekül Sauerstoff benötigt insgesamt vier Elektronen, um zwei Moleküle Wasser zu bilden. Nur wenige Moleküle können Sauerstoff aufgrund seiner ungewöhnlichen Elektronenspinconfiguration vollkommen reduzieren. Somit ist es viel wahrscheinlicher, dass er nur teilweise reduziert wird. Dadurch können instabile ROS entstehen (Pryor 1986; Møller et al. 2007). Die Produktion ist besonders für Pflanzen ein enormes Problem, da sie nicht in ungefährlichere Gefilde ausweichen können und eine Umgebung die Photosynthese begünstigt, auch zwangsläufig zur Bildung von ROS führt (Gest et al. 2012). Da dies sehr reaktive Moleküle sind können sie alle Typen von Zellkomponenten oxidieren. In einem gewissen Maß kann die Zelle dies kompensieren, und die Veränderungen können für metabolische Regulationen z.B. die Oxidation von Cysteinproteinen oder als Signalmoleküle genutzt werden. In anderen Fällen verhindert die Modifikation die ursprüngliche Funktion des Proteins, es wird geschädigt und der programmierte Zelltod kann eintreten. Typischerweise liegen unter Stressbedingungen bei einem erhöhten ROS-Level größere Schäden vor. Zusammenfassend verkörpern Schaden und Signalwirkung zwei wichtige Aspekte dieses Phänomens (Møller et al. 2007).

Aus den genannten Gründen musste sich ein antioxidatives System entwickeln, damit Pflanzen sich an umweltbedingte Veränderungen, z.B. einen erhöhten Sauerstoffgehalt oder den Übergang vom Wasser zum Land, anpassen können. Antioxidantien bieten Schutz vor Oxidation (Verlust von Elektronen), indem sie ihre Elektronen an die Moleküle abgeben und sie dadurch reduzieren. Ein gutes Antioxidans ist in seiner oxidierten Form nicht toxisch und kann auf einem anderen Weg wieder recycelt werden, indem es Elektronen von einer weiteren Quelle aufnimmt (Gest et al. 2012).

3.5.2.6.1 Ascorbat/Dehydroascorbat

Ascorbat kommt im pflanzlichen Organismus ubiquitär vor (Foyer et al. 1983). Im Sommer wiesen die Chloroplasten von zahlreichen Feldpflanzen mehr Ascorbatmoleküle als Chlorophyllmoleküle auf (Giroud 1938; Rabinowitch 1945) und es konnten Konzentrationen von bis zu 50 mM im Stroma von Chloroplasten detektiert werden (Gerhardt 1964). Ascorbat fungiert als exzellentes Antioxidans, da es seine Elektronen um den 5-Kohlenstoffring delokalisieren und somit viele ROS reduzieren kann (siehe Abbildung 15; Noctor und Foyer 1998; Foyer und Noctor 2011). Es kann aber nicht nur mit ROS reagieren, sondern auch schon oxidierte organische Moleküle, oft effizienter als Glutathion, reparieren (Tsuchiya et al. 1985; Niki 1991). Ascorbat wird aus seiner oxidierten Form durch spezifische Reduktasen und Elektronen von Glutathion, NADH oder NADPH im Ascorbat-Glutathion-Zyklus regeneriert (siehe Abbildung 14; Foyer und Noctor 2011).

Das Antioxidans Ascorbat ist bei Ozonbegasung einer der ersten Verteidigungsmechanismen der Pflanze (Frei et al. 1988; Asada 2000). Die oxidierte Form DHA wird durch die Dehydroascorbat Reduktase (DHAR), die GSH als Reduktionsmittel benutzt, zu der reduzierten Form AsA recycelt (siehe Abbildung 14). Verschiedene Autoren berichten über eine Induktion der DHAR nach Ozonbegasung (Pasqualini et al. 2001; Yoshida et al. 2006). In unseren Analysen konnte ein Anstieg des Dehydroxyascorbatgehalts nach Ende der Begasungsperiode (5 h) und nach 48 h ein signifikanter Anstieg um 104,3% festgestellt werden (siehe Abbildung 123). Dies kann durch eine langsame Oxidation von Ascorbat durch Ozon erklärt werden (Deutsch 1998; Zheng et al. 2000; El-Khatib 2003). Ein signifikantes Ansteigen von DHA konnte auch von Nagendra-Prasad et al. (2008) nach 24 h Ozonbegasung von *Lycopersicon esculentum* mit 200 ppb gemessen werden. Nach der direkten Oxidation von AsA im Extrazellulärraum muss neu synthetisiertes Ascorbat vom Zytosol exportiert werden, oder DHA wird in das Zytoplasma transportiert, um dort von der DHAR reduziert zu werden (Rautenkrantz et al. 1994; Horemans et al. 1998). In zukünftigen Untersuchungen sollte bestimmt werden, wie die DHAR in Melissenpflanzen auf Ozon reagiert. Höchstwahrscheinlich wird sie stimuliert, da wir nach 3 h einen signifikanten AsA-Anstieg als kurzfristige Reaktion auf das zugeführte Ozon feststellen konnten. AsA fungiert zum einen als Antioxidans, um die schädlichen ROS-Effekte zu kompensieren, zum anderen dient sie aber auch als Signalmolekül (Lomonte et al. 2010). Nach 12 h erfolgte ein Absinken des Ascorbats um 26,5%. Interessant ist zu sehen, dass die oxidierte Form (DHA) nach 12 h langsam ansteigt, da AsA wahrscheinlich durch Ozon oxidiert wurde. Voraussichtlich finden hier sowohl die Regeneration durch den Ascorbat-Glutathion-Zyklus als auch eine Neusynthese von AsA statt, denn nach 48 h ist ein signifikanter Anstieg des Ascorbatgehalts um 91,5% erkennbar.

Zahlreiche Versuche haben gezeigt, dass eine Ozonbegasung auch oftmals mit einem erhöhten Ascorbat-Gehalt einhergeht (Conklin et al. 1996; Zheng et al. 2000; Pasqualini et al. 2001; Di Baccio et al. 2008; Gillespie et al. 2011; Mishra et al. 2013; Pellegrini et al. 2013). Da ein Anstieg von reduziertem und oxidiertem Ascorbat beobachtet wurde, lässt sich auch der Anstieg an Gesamtascorbat (AsA+DHA) leicht erklären. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Ranieri et al. (2000) nach Ozonbegasung (150 ppb für vier Stunden an vier

Tagen) von Sonnenblumen (*Helianthus annuus* L.) erzielt. Interessanterweise korrelierte der Anstieg des Gesamtascorbats mit dem Anstieg des reduzierten Ascorbats. Der Redoxstatus von Ascorbat (Verhältnis von Ascorbat zu Gesamtascorbat) stieg nach 3 h an, um dann signifikant zu sinken. Direkt nach Beginn der Ozonbegasung wird ein hoher Gehalt an reduziertem Ascorbat benötigt. Doch durch das starke Ansteigen des Gesamtascorbatgehalts (AsA+DHA) sinkt logischerweise auch die Kapazität des Redoxstatus (AsA/ AsA+DHA). Ein Absinken des Redoxstatus in mit Ozon begasten Sonnenblumen wurde auch von Ranieri et al. (2000) festgestellt.

3.5.2.6.2 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl Radikal (DPPH[•])-Test

In den mit Ozon begasten Melissenpflanzen konnte 12, 24 und 48 h nach Beginn der Ozon-Begasungsperiode ein Anstieg der Radikalfängereigenschaft um fast 30% im Vergleich zu den Kontrollzeitpunkten festgestellt werden (siehe Abbildung 124). Alothman et al. (2010) konnten ein ähnliches Ergebnis nach Ozonbegasung in Guavenfrüchten feststellen.

Es existieren zahlreiche Untersuchungen zu den Radikalfängereigenschaften von *Melissa officinalis*, die wahrscheinlich auf den hohen RA-Gehalt zurückzuführen sind (Canelas und Costa 2007; Armatu et al. 2010). Die Untersuchung der ozonbegasten Melissenpflanzen im Jahr 2012 ergab eine Verminderung des RA-Gehalts (siehe Abbildung 119; Kapitel 3.5.1.4). Der Anstieg der Radikalfängereigenschaften in der Untersuchung, die im Jahr 2013 durchgeführt wurde, könnte z.B. auch durch Flavonoide, z.B. Catechin hervorgerufen werden. Unbedingt muss der RA-Gehalt von den Melissenpflanzen im Jahr 2013 noch untersucht werden, um festzustellen, ob das Absinken an RA hier ebenfalls auftritt.

3.5.2.6.3 H₂O₂-Gehalt und Katalaseaktivität

Möglicherweise ist an der Bildung des Superoxidradikalanions in Pflanzen eine zellmembran-gebundene NADPH-Oxidase beteiligt. Die Superoxidradikalanionen, die außerhalb pflanzlicher Zellen produziert werden, werden schnell zu Wasserstoffperoxid reduziert. Dieses Molekül kann die Zellmembran durchdringen und wird von der Katalase, der Ascorbatperoxidase oder der Glutathionperoxidase in Wasser umgewandelt (Buchanan 2000).

Innerhalb der pflanzlichen Zelle werden ROS beispielsweise in Chloroplasten, Mitochondrien und Peroxisomen gebildet (Jiménez et al. 1997), wobei singulärer Sauerstoff (¹O₂) den Ausgangszustand darstellt. Durch Aufnahme von einem, zwei oder drei Elektronen, durch Metallionen oder Semichinone, wird die Bildung von z.B. Superoxidradikalen (O₂^{•-}) Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Hydroxylradikalen (HO[•]) anregt (Mittler 2002). Sowohl das Superoxidradikal als auch das Hydroperoxylradikal (HO₂[•]) bewirken eine spontane Dismutation und können Wasserstoffperoxid produzieren (Blokhina et al. 2003).

Wie in Abbildung 125 erkennbar ist, stieg 24 h nach Beginn der Ozonbehandlung die H₂O₂-Menge signifikant um 46,5% an. Ansonsten lagen keine signifikanten Unterschiede vor. In den Untersuchungen an Melissenblättern im Jahr 2012 wurde der H₂O₂-Gehalt mikroskopisch mithilfe des DAB-Reagenz bestimmt (siehe Kapitel 3.5.1.1.2). Es konnten bei dieser

Untersuchung lokale H_2O_2 -Akkumulationen an allen untersuchten Zeitpunkten (3, 5, 12 und 24 h FBE) festgestellt werden (siehe Abbildung 114). Durch Verwendung des Amplex[®] Red Reagenz konnte die H_2O_2 -Menge im Jahr 2013 quantifiziert werden. Auch nach der Ozonbegasung (60 nI/l O_3 über 15 d für je 5 h) von *Populus deltoides* x *maximowiczii* konnte ein zehnfacher Anstieg von Wasserstoffperoxid gemessen werden (Di Baccio et al. 2008). Eine H_2O_2 -Akkumulation wird häufig bei Kurz- und Langzeitexperimenten mit hohen Ozonkonzentrationen festgestellt, bei denen der H_2O_2 -Anstieg diverse Reaktionen in der Pflanze, wie eine Proteinphosphorylierung, Enzymabbau, vermehrte Genexpression, programmierten Zelltod und Membrandenaturierung durch Lipidperoxidation und MDA-Generierung, auslöst (Neill et al. 2002; Vranová et al. 2002; Loreto et al. 2004; Diara et al. 2005; Kangasjärvi et al. 2005). Die Rolle von Wasserstoffperoxid als Signal- oder Regulatormolekül ist nicht klar definiert (Neill et al. 2002; Kangasjärvi et al. 2005). ROS und insbesondere H_2O_2 sind streng gesehen keine Signalmoleküle, da sie keine Ligand-Rezeptor-Interaktion aufweisen. Dennoch können Konzentrationsveränderungen den Redoxstatus der Zelle, die Aktivität von Transkriptionsfaktoren oder Sekundärbotenstoffen und sensitive Moleküle, wie Glutathion oder Ascorbat, verändern (Vranová et al. 2002; Kangasjärvi et al. 2005; Noctor 2006).

Katalase war das allererste antioxidative Enzym, welches überhaupt charakterisiert wurde. Loew stellte 1900 fest: „Es scheint keine Pflanze und kein Tier zu geben, welches ohne dieses bestimmte Enzym existiert.“

Sie befindet sich in Peroxysomen (Frederick und Newcomb 1969), dem Zytosol und Glyoxysomen (Buchanan et al. 2000). Die Katalase ist ein tetrameres Enzym mit einer Masse von 50-70 kDa (Regelsberger et al. 2002). Die typische Katalasereaktion ist die Dismutation von H_2O_2 zu Wasser und Sauerstoff (Salin 1987). Der K_m -Wert für H_2O_2 liegt zwischen 40 und 600 mM (Chelikani et al. 2004).

In den Melissenpflanzen konnte nach 5 h ein Anstieg von 211,8% und nach 48 h eine Verminderung um 51,1% gemessen werden (siehe Kapitel 3.5.1.8.7 und Abbildung 129). Auch Mhamdi et al. (2010) berichteten in ihrem Review über ein Ansteigen des Enzyms bei hohen Wasserstoffperoxidkonzentrationen. Es scheint zu einer starken Induktion der Katalase bei *Melissa officinalis* nach Ende der Ozonbegasungsperiode zu kommen. Auch Rozpądek et al. (2013) konnten einen leichten Anstieg der Katalaseaktivität 3-10 Wochen nach Ozonbegasung (70 ppb, 3 d) in *Brassica oleracea* feststellen. Auch Tang et al. (1999) berichteten über einen Anstieg der Katalaseaktivität um 23% nach Ozonexposition (150 nI/l 3 h pro Tag für 3 Tage) in *Trifolium repens*. Da jedoch in unseren Untersuchungen nach 24 h die H_2O_2 -Konzentration um fast 50% ansteigt, wird das Enzym wahrscheinlich oxidiert oder verbraucht und somit nimmt die Aktivität ab. McKee et al. (1997a) berichteten über eine signifikante Abnahme der Katalasekonzentration nach Ozonbegasung (60 nmol/mol) in *Triticum aestivum*.

3.5.2.6.4 Gesamtgehalt phenolischer Verbindungen

In dem Gehalt phenolischer Verbindungen werden z.B. Gallussäure, Catechin, Kaffeesäure, Cumarsäure, Ferulasäure, Rosmarinsäure, Chlorogensäure und Flavonoide erfasst (Sgarbi et al. 2003; Feng et al. 2010). Es war erkennbar, dass die Quantität an phenolischen Verbindungen in *Melissa officinalis* nach 5 h signifikant um 31,7% ab- und nach 48 h signifikant um 70,7% zunahm (siehe Abbildung 126). Auch Sgarbi et al. (2003) konnten eine Abnahme des Gehalts phenolischer Verbindungen nach Ozon-Begasung (2 h, 0,3 µmol/mol) in *Vitis vinifera*-Blättern feststellen. Niegowski beschrieb 1953 als einer der Ersten die Oxidation von Phenolen. Dies könnte die Abnahme nach Ende der Ozonbegasungsperiode (5 h) erklären. Bei den Untersuchungen der Melissenpflanzen im Jahr 2012 wurde ebenfalls eine Abnahme der RA 5 h nach Beginn der Ozonbegasungsperiode festgestellt (siehe Abbildung 119). Da damals kein 48 h FBE-Messzeitpunkt existierte, müssen unbedingt noch Versuche mit dem Blattmaterial aus dem Jahr 2013 zur Bestimmung des RA-Gehalts durchgeführt werden, um einen möglichen Anstieg zu detektieren. Die Rolle von Phenolen als mögliche antioxidative Systeme wird durch ihre mögliche Elektronenabgabe charakterisiert (Rice-Evans et al. 1997). In *Trifolium pratense* konnte ein Ansteigen des Gesamtphenolgehalts um 5-12% gemessen werden (Saviranta et al. 2010). Wahrscheinlich ist nach 48 h die Produktion der Phenole stark angestiegen, um die schädlichen Radikale zu dekompen­sieren (siehe Abbildung 126).

3.5.2.6.5 Prolin-Gehalt

Abgesehen von osmotischen Funktionen weist die Aminosäure Prolin (Pro) noch weitere Eigenschaften im pflanzlichen Organismus, wie das Aufrechterhalten des Redoxpotenzials oder Radikalfängerkapazitäten von Hydroxylradikalen, auf (Shao et al. 2008; Szabados und Savoure 2010). Außerdem schirmt es Proteinstrukturen gegen Denaturierung ab, stabilisiert Zellmembranen durch Interagieren mit Phospholipiden und dient als Energie- bzw. Stickstoffquelle (Aspinall und Paleg 1981; Samaras 1995). Prolin ist hauptsächlich als Indikator für Wasserstress bekannt (Bates et al. 1973). Mittlerweile konnte aber gezeigt werden, dass eine Akkumulation niedermolekularer Verbindungen, wie Prolin oder Betain, Pflanzen bei der Akklimatisierung an diverse Stressoren unterstützt (Dobra et al. 2010). Es konnte eine erhöhte Stresstoleranz gegenüber abiotischem Stress, wie Trockenheit, Schwermetallzufuhr und Kälte bei Pflanzen mit erhöhtem Prolingehalt festgestellt werden (Kishor et al. 2005).

Mithilfe einer angesäuerten Ninhydrinlösung konnte nach Entwicklung des roten Chromophors der Prolin-Gehalt bestimmt werden (siehe Kapitel 3.5.1.8.5). 24 h nach Beginn der Ozonbehandlung wurde im Vergleich mit den gleichaltrigen unbehandelten Kontrollpflanzen ein Anstieg um 61% und nach 48 h um 35% beobachtet (siehe Abbildung 127). Auch El-Khatib (2003) konnte einen starken Anstieg des Prolingehalts in *Medicago sativa* (80,7%), *Sonchus oleraceus* (78,2%) und *Senecio vulgaris* (66%) nach Ozonbega-

sung (100 ppb, 5 d für je 5 h) beobachteten. Ebenso Manninen et al. (2000) erzielten nach Ozonbegasung einen Anstieg der Serin- und Prolinkonzentrationen in Kiefernadeln.

3.5.2.6.6 Bestimmung der Carotinoide

In unserer täglichen Nahrung existieren mehrere Dutzend verschiedene Carotinoide, und die meisten weisen eine hohe antioxidative Kapazität auf. Schon 1941 erkannten Wissenschaftler die antikarzinogene und antidiabetische Wirkung von β -Carotin beim Menschen (Abels et al. 1941; Murrill et al. 1941).

Carotinoide kommen beispielsweise in farbigen Pflanzenteilen und Mikroorganismen vor. Sie werden folgendermaßen klassifiziert: Carotine sind Kohlenwasserstoffe und enthalten spezifische Endgruppen (Lycopon besitzt zwei acyclische Endgruppen, β -Carotin hat zwei Cyclohexen-Endgruppen). Xanthophylle sind oxygenierte Carotinoide. Zeaxanthin und Lutein besitzen eine Hydroxygruppe, wobei Spirilloxanthin eine Methoxygruppe, Echinenon eine Oxogruppe und Antheraxanthin eine Epoxygruppe aufweist (Goodwin 1980; siehe Abbildung 11). β -Carotin kann direkt ROS (z.B. $^1\text{O}_2$, siehe Kapitel 1.6.4) unschädlich machen und spielt eine große Rolle im Zellschutz (Di Mascio et al. 1989). Außerdem ist es das vorherrschendste Carotin (Paiva und Russell 1999).

Die Bestimmung der Carotinoide erfolgt durch die Addition der Mengen von Lutein, β -Carotin, Neoxanthin, Violaxanthin und Antheraxanthin. Es konnte nach 48 h ein signifikanter Anstieg (+110,8%) im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen festgestellt werden (siehe Abbildung 128). Auch in den Untersuchungen mit Melisse im Jahr 2012 konnte ein Anstieg an β -Carotin (siehe Tabelle 2), nach Ozonbehandlung, festgestellt werden. Calatayud und Barreno (2004) konnten ein Absinken der Carotinoide nach Ozonbegasung von *Lactuca sativa* beobachten. Ein Ansteigen der Carotinoide nach akuter Ozonbegasung (80 ppb für 7 h) konnte in *Phaseolus vulgaris* von Leitao et al. (2008) gemessen werden. Möglicherweise reagierten die Melissenpflanzen mit einem Ansteigen der Carotinoide, um über konjugierte Doppelbindungen Chlorophyll im Triplettzustand auszuschalten (Pellegrini et al. 2013).

Zusammenfassend kann die Behauptung aufgestellt werden, dass die Arzneipflanze *Melissa officinalis* äußerst sensitiv auf geringe Ozonkonzentrationen mit Veränderungen der Photosyntheserate, Aktivierung des antioxidativen Systems, Lipidperoxidationen sowie mit makroskopischen und mikroskopischen Schäden reagierte. Außerdem konnte ein Einfluss auf den Sekundärstoffwechsel durch die Analyse der RA und der an deren Biosynthese beteiligten Enzyme (PAL, RAS) festgestellt werden. Auch auf molekularbiologischer Ebene zeigte sich anhand von Expressionsstudien der PAL-, 4CL-, TAT- und RAS-Gene eine schnelle Induktion der untersuchten Gene.

4. Summary

Hydroxycinnamic esters and amides e.g. hydroxycinnamoylquinic, hydroxycinnamoylshikimate, hydroxycinnamoyltyramine and rosmarinic acid are quite abundant in the plant kingdom. Plants can use these compounds as defense strategies against herbivores, pathogens or UV-irradiation. Rosmarinic acid synthase (RAS, 4-coumaroyl-CoA:hydroxylphenyllactic acid hydroxycinnamoyltransferase) is an important enzyme in the formation of rosmarinic acid (RA), the main phenolic compound in *Coleus blumei*. For structural analyses of RAS, the RAS-cDNA was heterologously expressed in *Escherichia coli*. The protein was mostly found as insoluble inclusion bodies. After solubilization and refolding of CbRAS, the protein was insufficiently active. So the expression was performed with SoluBL21TM *E. coli* and after purification by gel permeation chromatography, very active and pure protein could be used for crystallization. Unfortunately no crystals were growing.

RAS, HST (hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate hydroxycinnamoyltransferase), which is important for the formation of monolignols, and HQT (hydroxycinnamoyl-CoA:quinic acid hydroxycinnamoyltransferase), a compound essential for the formation of chlorogenic acid (CA), are important members of the hydroxycinnamoyltransferases (HCTs). The cloning and characterization of these HCTs present in *Glechoma hederacea* was an objective of this study. *Glechoma hederacea* L. (Lamiaceae) is a perennial plant, which is distributed widely in Europe, Asia and America and an ideal candidate, because it produces RA, CA and caffeic acid. By several attempts a partial sequence putatively encoding a HSCQT was isolated from *Glechoma hederacea*. Additionally, the presence of caffeic acid, CA, RA and the transcript abundances of RAS, HST and an unknown HCT in flowers, leaves, stems and roots of naturally grown *G. hederacea* were determined. The RAS, HST and HCT genes were expressed in all organs apart from roots. Flowers accumulated astonishingly 12.5% RA in their dry mass and leaves, stems and roots around 1%. The highest CA content was measured in leaves (2.0%), while it was 1.6% in flowers, 1.3% in stems and almost undetectable in roots. The caffeic acid content stagnated at or below 0.4% of the dry weight in all organs.

In another part of this project the accumulation of caffeic acid, CA and RA and the determination of RAS and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activities in a suspension culture of *Glechoma hederacea* was studied. Growth, medium and secondary metabolism parameters were assessed during a cultivation period of 14 days. The maximum PAL activity was observed on day 5, while the maximum of the RAS activity was accomplished on day 8. The main caffeic acid derivative definitely was RA, which reached 25.9% of the dry mass on day 7. This is among the highest level of a secondary metabolite in plant cells ever observed. Caffeic acid and CA contents remained rather low, with the highest CA content on day 1 (0.4%).

The activity and substrate acceptance of already constructed chimeric proteins consisting of RAS and HST halves (CbRAS/HST, CbHST/RAS) were determined. The assumption is that hydroxycinnamoyltransferases are formed by two almost equally sized domains I and II. The

chimeras were designed by exchanging the two main domains of RAS and HST, which is important for the formation of monolignols. RAS and HST activity assays revealed low RAS-activities in both chimeric proteins while HST activity could not be detected.

Lemon balm (*Melissa officinalis*) is a commonly used medicinal plant, which belongs to the family Lamiaceae (subfamily Nepetoideae). The pharmaceutical properties are e.g. sedative, carminative, spasmolytic, antibacterial and antiviral mostly due to the content of essential oil (citral, citronellal) and phenolic acid esters. The influence of low ozone concentrations on primary and secondary metabolism of lemon balm was studied. *Melissa* plants were exposed to low ozone (O₃) dosages (80 ppb for 5 h), because high background levels of O₃ are considered to be as harmful as episodic O₃ peaks. Samples were taken 0, 3, 5, 12 and 24 h from beginning of exposure (FBE). The influence on different ecophysiological, biochemical and structural parameters were analyzed. At the end of the ozone exposure, no visible foliar symptoms were detectable, but at microscopic level a small number of dead cells were found. Nevertheless several photosynthetic reactions were significantly affected. The maximum photosynthetic activity significantly decreased and this reduction was maintained during the entire observation period. Interacellular CO₂ concentration significantly increased in comparison to the control level (+63%). Furthermore a severe membrane damage, assessed by increase of malondialdehyde could be observed. The chlorophyll a/b ratio and the de-epoxidation index increased, indicating a possible regeneration of the plants and a marked activation of photoprotective mechanisms.

Several enzymes are responsible for the biosynthesis of RA, among them PAL, 4-coumarate:coenzyme A ligase (4CL), tyrosine aminotransferase (TAT) and RAS. The transcript levels of these genes have been investigated by quantitative RT-PCR in lemon balm. All analyzed genes were quickly up-regulated at 3 h of O₃ exposure, but at 24 h from beginning of exposure (FBE) only RAS and PAL were up-regulated. The specific activity of RAS was closely correlated with a decrease in RA content, while the specific activity of PAL increased at 12 h FBE to 163% in comparison to control levels.

In a second treatment with 80 ppb ozone for 5 h the antioxidant effects of *Melissa officinalis* were assessed. Sampling took place 0, 3, 5, 12, 24 and 48 h FBE. A significant increase of ascorbate, dehydroascorbate, total ascorbate 48 h FBE (+91.5%, +104.3%, +99.6%) and a biphasic redox status was measured. Strong scavenging capacities (48 h FBE: 27.3%), measured with the DPPH assay, were correlating with a high content of total phenols (48 h FBE: 70.7%) and carotenoids (48 h FBE: 110.8%). Furthermore the hydrogen peroxide and proline contents also increased significantly 48 h FBE. The catalase activity showed a biphasic trend with an increase 5 h FBE and a decrease 48 h FBE.

In conclusion these experiments provide insight into the effect of abiotic stress caused by ozone on the pharmaceutically important plant *Melissa officinalis*.

5. Veröffentlichungen

Publikationen

Döring AS, Pellegrini E, Campanella A, Trivellini A, Gennai C, Petersen M, Nali C, Lorenzini G: How sensitive is *Melissa officinalis* to realistic ozone concentrations? Plant Physiol Biochem 74:156-164

Döring AS, Pellegrini E, Della Bartola M, Nali C, Lorenzini G, Petersen M: How do background ozone concentrations affect the biosynthesis of rosmarinic acid in *Melissa officinalis*? J Plant Physiol 171:35-41

Döring AS, Petersen M: Production of caffeic, chlorogenic and rosmarinic acids in plants and suspension cultures of *Glechoma hederacea*. Phytochem Lett, zur Veröffentlichung eingereicht

Vorträge

Hydroxycinnamoyltransferases of *Coleus blumei*. Wissenschaftliche Vortragsreihe am Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie Marburg im Juni 2011

Ozone stress in *Melissa officinalis* plants assessed by photosynthetic functions. Wissenschaftliche Vortragsreihe am Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie Marburg im Juni 2012

Hydroxycinnamoyltransferases from *Glechoma hederacea*. Tagung der Sektion „Pflanzliche Naturstoffe“ der Deutschen Botanischen Gesellschaft in Hildesheim im September 2012

How sensitive is *Melissa officinalis* to low ozone concentrations? Vortrag an der Università di Pisa im März 2013

How sensitive is *Melissa officinalis* to low ozone concentrations? Wissenschaftliche Vortragsreihe am Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie Marburg im Juni 2013

Posterpräsentationen

Döring AS, Sander M, Petersen M: Hydroxycinnamoyltransferases from *Coleus blumei* and *Glechoma hederacea*. Internationale Tagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Berlin 2011

Döring AS, Pellegrini E, Della Bartola M, Nali C, Lorenzini G, Petersen M: How do background ozone concentrations affect the biosynthesis of rosmarinic acid in *Melissa officinalis*? Internationale Tagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Tübingen 2013

6. Referenzen

- Abdullah Y, Schneider B, Petersen M (2008) Occurrence of rosmarinic acid, chlorogenic acid and rutin in Marantaceae species. *Phytochem Lett* 1:199-203
- Abels JC, Gorham AT, Park GT, Rhoads CP (1941) Metabolic studies in patients with cancer of the G. I. tract. 1. Plasma vitamin A levels in patients with malignant neoplastic disease, particularly of the G. I. tract. *J Clin Invest* 20:749-764
- Abohatem M, Zouine J, El Hadrami I (2011) Low concentrations of BAP and high rate of subcultures improve the establishment and multiplication of somatic embryos in date palm suspension cultures by limiting oxidative browning associated with high levels of total phenols and peroxidase activities. *Sci Hort* 130:344-348
- Addicott FT, Lyon JL, Ohkuma K, Thiessen WE, Carns HR, Smith OE, Cornforth JW, Milborrow BV, Ryback G und Wareing PF (1968) Absciscic acid: a new name for abscisin II (dormin). *Science* 159:1493
- Ainsworth EA, Yendrek CR, Sitch S, Collins WJ, Emberson LD (2012) The effects of tropospheric ozone on net primary productivity and implications for climate change. *Annu Rev Plant Biol* 63:637-661
- Allegrini I, Cortiello M, Manes F, Tripodo P (1994) Physico-chemical and biological monitoring as integrated tools in evaluating tropospheric ozone in urban and semi-rural areas. *Sci Total Environ* 141:75-85
- Allen LH (1990) Plant responses to rising carbon dioxide and potential interactions with air pollutants. *J Environ Qual* 19:15-34
- Alothman M, Kaur B, Fazilah A, Bhat R, Karim AA (2010) Ozone-induced changes of antioxidant capacity of fresh-cut tropical fruits. *Innov Food Sci Emerg* 11:666-671
- Amiri H (2007) Quantative and qualative changes of essential oil of *Salvia bracteata* Bank et Sol. in different growth stages. *Daru* 15:79-82
- Anfinsen CB (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181:223-230
- Armatu A, Colceru-Mihul S, Bubueanu C, Draghici E, Pirvu L (2010) Evaluation of antioxidant and free scavenging potential of some Lamiaceae species growing in Romania. *Rom Biotech Lett* 15:5274-5280
- Asada K (2000) The water–water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philos Trans R Soc London B Biol Sci* 355:1419–1431
- Asensi-Fabando A, Garcia-Breijo FJ, Reig-Arminana J (2010) Ozone-induced reductions in below-ground biomass: an anatomical approach in potato. *Plant Cell Environ* 33:1070-1083
- Aspinall D, Paleg LG (1981) Proline accumulation: physiological aspects, in: L.G. Paleg, D. Aspinall (Eds.), *The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants*, Academic Press, Sydney, pp. 205-241
- Astani A, Reichling J, Schnitzler P (2012) *Melissa officinalis* extract inhibits attachment of Herpes simplex virus in vitro. *Chemotherapy* 58:70-77
- Avery OT, Macleod CM, McCarty M (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of trans-formation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. *J Exp Med* 79:137-158
- Babulka P (2005) La mélisse (*Melissa officinalis* L.). *Phytotherapie* 3:114-117
- Baher FZ, Mirza M, Ghorbanli M, Rezaii MB (2002) The influence of water stress on plant height, herbal and essential oil yield and composition in *Satureja hortensis* L.. *Flav Fragr J* 17:275-277
- Baier M, Kandlbinder A, Gollack D, Dietz KJ (2005) Oxidative stress and ozone: perception, signalling and response. *Plant Cell Environ* 28:1012-1020

- Bais HP, Walker TS, Schweizer HP, Vivanco JM (2002) Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Plant Physiol Biochem* 40:983-995
- Bajaj YPS (1994) Medicinal and aromatic plants VI: *Coleus* spp: in vitro culture and production of forskolin and rosmarinic acid. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. pp 69-92
- Baker NR (2008) Chlorophyll fluorescence: A Probe of Photosynthesis in vivo. *Annu Rev Plant Biol* 59:89-113
- Barberini S, Savona M, Raffi D, Leonardi M, Pistelli La, Stochmal A, Vainstein A, Pistelli Lu, Ruffoni B (2013) Molecular cloning of SoHPPR encoding a hydroxyphenylpyruvate reductase, and its expression in cell suspension cultures of *Salvia officinalis*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 114:131-138
- Barsalobres-Cavallari CF, Severino FE, Maluf MP, Maia IG (2009) Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. *BMC Molecular Biology* 10:1
- Barton C (2011) Studying the effects of rising atmospheric CO₂ concentration on the water use efficiency of *Eucalyptus saligna*. The 12th National Street Tree Symposium 2011, pp. 51-56
- Basher RE (1985) Review of the Dobson spectrophotometer and its accuracy. World Meteorological Organization Ozone Project Report:13, Geneva. Research and Monitoring Project, Report No. 13, WMO, Geneva
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of proline for waterstress studies. *Plant & Soil* 39:205-207
- Bauer N, Kiseljak D, Jelaska S (2009) The effect of yeast extract and methyl jasmonate on rosmarinic acid accumulation in *Coleus blumei* hairy roots. *Biol Plant* 53:650-656
- Baumann TW, Röhrig L (1989) Formation and intracellular accumulation of caffeine and chlorogenic acid in suspension cultures of *Coffea arabica*. *Phytochemistry* 28:2667-2669
- Bayat M, Tameh AA, Ghahremani MH, Akbari M, Mehr SE, Khanavi M (2012) Neuroprotective properties of *Melissa officinalis* after hypoxic-ischemic injury both in vitro and in vivo. *Daru* 20:42
- Beggs CJ, Kuhn K, Btucker R, Wellmann E (1987) Phytochrome-induced flavonoid biosynthesis in mustard (*Sinapis alba* L.) cotyledons: Enzymic control and differential regulation of anthocyanin and quercetin formation. *Planta* 172:121-126
- Bennett TP (1967) Membrane Filtration for determining Protein in the Presence of Interfering Substances. *Nature* 213:1131-1132
- Benvenuti S, Pellati F, Melegari M, Bertelli D (2004) Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of rubus, ribes, and aronia. *J Food Sci* 69:164–169
- Berberich T, Sugawara K, Harada M, Kusano T (1995) Molecular cloning, characterization and expression of an elongation factor 1 α gene in maize. *Plant Mol Biol* 29:611-615
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2002) Biochemistry. 5th edition. New York: W H Freeman. Immunology Provides Important Techniques with which to Investigate Proteins, pp 638-665
- Berger A, Meinhard J, Petersen M (2006) Rosmarinic acid synthase is a new member of the superfamily of BAHD acyltransferases. *Planta* 224:1503-1510
- Bergmann E, Bender J, Weigel J (1999) Ozone threshold doses and exposure-response relationships for the development of ozone injury symptoms in wild plant species. *New Phytol* 144:423-435
- Bézier A, Lambert B, Baillieul F (2002) Study of defense-related gene expression in grapevine leaves and berries infected with *Botrytis cinerea*. *Eur J Plant Pathol* 108:111-120
- Biagioni M, Nali C, Heimler D, Lorenzini G (1997) PAL activity and differential ozone sensitivity in tobacco, bean and poplar. *J Phytopathol* 145:533-539
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acid Res* 7:1513-1523
- Biswas DK, Jiang GM (2011) Differential drought-induced modulation of ozone tolerance in winter wheat species. *J Exp Bot* 62:4153-4162

- Björkman O, Demming B (1987) Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origin. *Planta* 170:489-504
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Ann Bot* 91:179-194
- Bolwell GP (1992) A role for phosphorylation in the down-regulation of phenylalanine ammonia-lyase in suspension cultured cells of French bean. *Phytochemistry* 31:4081-4086
- Booker FL, Miller JE (1998) Phenylpropanoid metabolism and phenolic composition of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] leaves following exposure to ozone. *J Exp Bot* 49:1191-1202
- Bortier K, Ceulemans R, de Temmerman L (2000) Effects of ozone exposure on growth and photosynthesis of beech seedlings (*Fagus sylvatica*). *New Phytol* 146:271-280
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Brezová V, Šlebodová A, Staško A (2009) Coffee as a source of antioxidants: An EPR study. *Food Chem* 114:859-868
- Brock TD, Freeze H (1969) *Thermus aquaticus*, a Nonsporulating Extreme Thermophile. *J Bact* 98:289-297
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (2000) Biochemistry and molecular biology of plants. Courier Companies, Inc.
- Bungard RA, Ruban AV, Hibberd JM, Press MC, Horton P, Scholes JD (1999) Unusual carotenoid composition and a new type of xanthophyll cycle in plants. *Plant Biol* 96:1135-1139
- Burleigh SH (2001) Relative quantitative RT-PCR to study the expression of plant nutrient transporters in arbuscular mycorrhizas. *Plant Sci* 160:899-904
- Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrin* 25:169-193
- Butler WL (1978) Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol* 29:345-378
- Cabané M, Pireaux JC, Léger E, Weber E, Dizengremel P, Pollet B, Lapierre C (2004) Condensed lignins are synthesized in poplar leaves exposed to ozone. *Plant Physiol* 134:586-594
- Calatayud A, Barreno E (2004) Response to ozone in two lettuce varieties on chlorophyll a fluorescence, photosynthetic pigments and lipid peroxidation. *Plant Physiol Biochem* 42:549-555
- Calatayud V, García-Breijo FJ, Cervero J, Reig-Armiñana J, Sanz MJ (2011) Physiological, anatomical and biomass partitioning responses to ozone in the Mediterranean endemic plant *Lamottea diana*. *Ecotox Environ Saf* 74:1131-1138
- Canelas V, Costa CT (2007) Quantitative HPLC analysis of rosmarinic acid in extracts of *Melissa officinalis* and spectrophotometric measurement of their antioxidant activities. *J Chem Educ* 84:1502-1504
- Casper-Lindley C, Bjorkman O (1998) Fluorescence quenching in four unicellular algae with different light-harvesting and xanthophyll cycle pigments. *Photosynth Res* 56:277-289
- Chappel J, Hahlbrock K (1984) Transcription of plant defence genes in response to UV light or fungal elicitor. *Nature* 311:76-78
- Chelikani P, Fita I, Loewen PC (2004) Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci* 61:192-208
- Chiang LC, Chiang W, Chang MY, Ng LT, Lin CC (2002) Antiviral activity of *Plantago major* extracts and related compounds in vitro. *Antiviral Res* 55:53-62
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159
- Christie PJ, Alfenito MR, Walbot V (1994) Impact of low temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta* 194:541-549

- Ciampi A, Castagna A, Ranieri A, Nali C, Lorenzini G, Soldatini GF (1997) CO₂ assimilation, xanthophyll cycle pigment and PSII efficiency in pumpkin plants as affected by ozone fumigation. *Physiol Plant* 10:881-889
- Clé C, Hill LM, Niggeweg R, Martin CR, Guisez Y, Prinsen E, Jansen MA (2008) Modulation of chlorogenic acid biosynthesis in *Solanum lycopersicum*: consequences for phenolic accumulation and UV-tolerance. *Phytochemistry* 69:2149-2156
- Clifford MN, Walker R (1987) Letter to the editor: Chlorogenic acids – confounders of coffee-serum cholesterol relationships. *Food Chem* 24:77-80
- Clifford MN (1999) Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric* 79:362-372
- Comino C, Lanteri S, Portis E, Acquadro A, Romani A, Hehn A, Larbat R, Bourgaud F (2007) Isolation and functional characterization of a cDNA coding a hydroxycinnamoyl-transferase involved in phenylpropanoid biosynthesis in *Cynara cardunculus* L.. *BMC Plant Biol* 7:14
- Comino C, Hehn A, Moglia A, Menin B, Bourgaud F, Lanteri S, Portis E (2009) The isolation and mapping of a novel hydroxycinnamoyltransferase in the globe artichoke chlorogenic acid pathway. *BMC Plant Biol* 9:30
- Compton SJ, Jones CG (1985) Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* 151:369-374
- Conklin PL, Williams EH, Last RL (1996) Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9970–9974
- Copping GP, East KSM (1986d) Homidium chloride. Teratogenicity study by the intravenous route in the rabbit. May & Baker Research Report, R.Tox. 600, submitted to WHO by RMB Animal Health Ltd., Essex, England.
- Couteau D, McCartney AL, Gibson GR, Williamson G, Faulds CB (2001) Isolation and characterisation of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid. *J Appl Microbiol* 90:873-881
- Coyle M, Fowler D, Ashmore M (2003) New directions: implications of increasing tropospheric background ozone concentrations for vegetation. *Atmos Environ* 37:153-154
- Cramer CL, Edwards K, Dron M, Liang X, Dildine SL, Bolwell GP, Dixon RA, Lamb CJ, Schuch W (1989) Phenylalanine ammonia-lyase gene organization and structure. *Plant Mol Biol* 12:367-383
- Crutzen PJ, Isaksen IS, Reid GC (1975) Solar proton events: stratospheric sources of nitric oxide. *Science* 189:457-459
- Cukovic D, Ehrling J, VanZiffle JA, Douglas CJ (2001) Structure and evolution of 4-coumarate:coenzyme A ligase (4CL) gene families. *Biol Chem* 382:645-654
- Czworkowski J, Moore PB (1996) The elongation phase of protein synthesis. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 54:293-332
- Dat J, Vandenabeele S, Vranova E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* 57:779-795
- D'Auria JC (2006) Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. *Curr Opin Plant Biol* 9:331-340
- Davis BJ (1964) Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann N Y Acad Sci* 121:404-427
- Davison AW, Barnes JD (1998) Effects of ozone on wild plants. *New Phytol* 139:135–151
- Dawnay L, Mills G (2009) Relative effects of elevated background ozone concentrations and peak episodes on senescence and above-ground growth in four populations of *Anthoxanthum odoratum* L. *Environ Pollut* 157:503-510
- De-Eknamkul W, Ellis BE (1987a) Purification and characterization of tyrosine aminotransferase activities from *Anchusa officinalis* cell cultures. *Arch Biochem Biophys* 257:430–438
- De-Eknamkul W, Ellis BE (1987b) Tyrosine aminotransferase: the entrypoint enzyme of the tyrosine-derived pathway in rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry* 26:1941–1946

- Degl'Innocenti E, Vaccà C, Guidi L, Soldatini GF (2003) CO₂ photoassimilation and chlorophyll fluorescence in two clover species showing different response to O₃. *Plant Physiol Biochem* 41:485–493
- Del Bano MJ, Lorente J, Castillo J, Benavente-Garcia O, del Rio JA, Ortuno A, Quirin KW, Gerard D (2003) Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 51:4247-4253
- Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N (2005) A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 15: 316-328
- Demmig B, Winter K, Krüger A, Czygan FC (1987) Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves: a possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light energy. *Plant Physiol* 84:218-224
- Demmig-Adams B, Adams III WW (1996) Xanthophyll cycle and light stress in nature: uniform response to excess direct sunlight among higher plant species. *Planta* 198:460-470
- Denslow SA, Reuschhoff EE, Daub ME (2007) Regulation of the *Arabidopsis thaliana* vitamin B₆ biosynthesis genes by abiotic stress. *Plant Physiol Biochem* 45:152-161
- Deutsch JC (1998) Oxygen-accepting antioxidants which arise during ascorbate oxidation. *Anal Biochem* 265:238-245
- Diara C, Castagna A, Baldan B, Mensuali-Sodi A, Sahr T, Langebartels C, Sebastiani L, Ranieri A (2005) Differences in the kinetics and scale of signalling molecule production modulate the ozone sensitivity of hybrid poplar clones: the roles of H₂O₂, ethylene and salicylic acid. *New Phytol* 168:351-364
- Di Baccio D, Castagna A, Paoletti E, Sebastiani L, Ranieri A (2008) Could the differences in O₃ sensitivity between two poplar clones be related to a difference in antioxidant defense and secondary metabolic response to O₃ influx? *Tree Physiol* 28:1761-1772
- Di Mascio P, Kaiser S, Sies H (1989) Lycopene as the most efficient singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys* 274:532-538
- Dixon RA, Paiva N (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7:1085-1097
- Dobra J, Motyka V, Dobrev P, Malbeck J, Prasil IT, Haisel D, Gaudinova A, Havlova M, Gubis J, Vankova R (2010) Comparison of hormonal responses to heat, drought and combined stress in tobacco plants with elevated proline content. *J Plant Physiol* 167:1360-1370
- Dobson GMB (1968) 40 Years Research on Atmospheric Ozone at Oxford - A History. *Appl Optics* 7:387-405
- Dubois JJB, Fiscus EL, Booker FL, Flowers MD, Reid CD (2007) Optimizing the statistical estimation of the parameters of the Farquhar-von Caemmerer-Berry model of photosynthesis. *New Phytol* 176:402-414
- Durso ND, Cyr RJ (1994) A calmodulin-sensitive interaction between microtubules and a higher plant homolog of elongation factor-1 ϵ L. *Plant Cell* 6:893-905
- Eberle D, Ullmann P, Werck-Reichhart D, Petersen M (2009) cDNA cloning and functional characterisation of CYP98A14 and NADPH:cytochrome P450 reductase from *Coleus blumei* involved in rosmarinic acid biosynthesis. *Plant Mol Biol* 69:239-253
- Eckey-Kaltenbach HE, Ernst D, Heller W, Sandermann H Jr. (1994) Biochemical plant response to ozone IV. (Cross-induction of defensive pathways in parsley (*Petroselinum crispum* L.) plants). *Plant Physiol* 104:67-74
- EEA (2010) Air pollution by ozone across Europe during summer 2009. Overview of exceedances of EC ozone threshold values for April-September 2009. Technical Report No 2/2010, European Environment Agency, Copenhagen
- EEA (European Environment Agency), Technical report 3/2013, 21 <http://www.eea.europa.eu/publications/air-pollution-by-ozone-across-EU-2012>, accessed in 22 July 2013
- Ehrling J, Hamberger B, Million-Rousseau R, Werck-Reichhart D (2006) Cytochromes P450 in phenolic metabolism. *Phytochem Rev* 5:239-270

- El-Khatib AA (2003) The response of some common Egyptian plants to ozone and their use as biomonitors. *Environ Pollut* 124:419-428
- Ellis BE, Towers GHN (1970) Biogenesis of rosmarinic acid in *Mentha*. *Biochem J* 118:291–297
- Englberger W, Hadding U, Etschenberg E, Graf E, Leyck S, Winkelmann J, Parnham MJ (1988) Rosmarinic acid: a new inhibitor of complement C3-convertase with anti-inflammatory activity. *Int J Immunopharmac* 10:729-737
- Falkowski PG (2006) Evolution. Tracing oxygen's imprint on earth's metabolic evolution. *Science* 311:1724–1725
- Faoro F, Iriti M (2005) Cell death behind invisible symptoms: early diagnosis of ozone injury. *Biol Plant* 49:585-592
- Feng Z, Wang X, Zheng Q, Feng Z, Xie J, Zhan C (2006) Responses of gas exchange of rape to ozone concentration and exposure regime. *Acta Ecol Sinica* 26:823-829
- Feng L, Jia X, Zhu M, Chen Y, Shi F (2010) Antioxidant activities of total phenols of *Prunella vulgaris* L. in vitro and in tumor-bearing mice. *Molecules* 15:9145-9156
- Ferrante A, Trivellini A, Borghesi E, Vernieri P (2012) Chlorophyll a Fluorescence as a Tool in Evaluating the Effects of ABA Content and Ethylene Inhibitors on Quality of Flowering Potted *Bougainvillea*. *Sci World J* 2012:1-11
- Fischer HOL, Dangschat G (1932) Konstitution der Chlorogensäure (3. Mitteil. über Chinasäure und Derivate). *Ber Deut Chem Ges* 65:1037-1040
- Fischnich O (1935) Über den Einfluss von β -Indolylessigsäure auf die Blattbewegungen und die Adventivwurzelbildung von *Coleus*. *Planta* 24:552-583
- Fletcher RS, Slimmon T, McAuley CY, Kott LS (2005) Heat stress reduces the accumulation of rosmarinic acid and the total antioxidant capacity in spearmint (*Mentha spicata* L.). *J Sci Food Agric* 85:2429-2436
- Folin O (1927) Tyrosine and tryptophan determinations in proteins. *J Biol Chem* 73:649-672
- Foyer CH, Rowell J, Walker D (1983) Measurements of the ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination. *Planta* 157:239–244
- Foyer CH, Harbinson J (1999) Relationships between antioxidant metabolism and carotenoids in the regulation of photosynthesis. In HA Frank, AJ Young, G Britton, RJ Cogdell, eds, *The Photochemistry of Carotenoids*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 305–325
- Foyer CH, Noctor G (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol* 155:2–18
- Francini A, Nali C, Pellegrini E, Lorenzini G (2008) Characterization and isolation of some genes of the shikimate pathway in sensitive and resistant *Centaurea jacea* plants after ozone exposure. *Environ Pollut* 151:272-279
- Franke R, Humphreys JM, Hemm MR, Denault JW, Ruegger MO, Cusumano JC, Chapple C (2002) The *Arabidopsis* REF8 gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism. *Plant J* 30:33-45
- Frederick S E, Newcomb EH (1969) Cytochemical localization of catalase in leaf microbodies (peroxisomes) *J Cell Biol* 43:343-353
- Frei B, Stocker R, Ames BN (1988) Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:9748–9752
- Fridovich I (1986) Biological effects of superoxid radical. *Arch Biochem Biophys* 247:1-11
- Fritsche J, Beindroff CM, Dachtler M, Zhang H, Lammers JG (2002) Isolation, characterization and determination of minor artichoke (*Cynara scolymus* L.) leaf extract compounds. *Eur Food Res Technol* 215:149-157
- Frohman MA, Martin GR (1989) Rapid amplification of cDNA ends using nested primers. *Tech* 1:165–173
- Gerhardt B (1964) Untersuchungen über Beziehungen zwischen Ascorbinsäure und Photosynthese. *Planta* 61:101-129
- Gest N, Gautier H, Stevens R (2012) Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule? *J Exp Bot* 64:33–53

- Gillespie KM, Rogers A, Ainsworth EA (2011) Growth at elevated ozone or elevated carbon dioxide concentration alters antioxidant capacity and response to acute oxidative stress in soybean (*Glycine max*). J Exp Bot 62:2667–2678
- Gillet F, Mesnard F, Fliniaux O, Monti JP, Fliniaux M (1999) Chlorogenic acid in a *Nicotiana plumbaginifolia* cell suspension. Plant Physiol Biochem 37:869-875
- Giroud A (1938) L'acide ascorbique dans la cellule et les tissus. Bornträger, Berlin
- Giuliano G, Bartley GE, Scolnik PA (1993) Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. Plant Cell 5:379-387
- Gonzalez MC, Echevarria C, Vidal J, Cejudo FJ (2002) Isolation and characterisation of a wheat phosphoenolpyruvate carboxylase gene. Modelling of the encoded protein. Plant Sci 162:233-238
- Goodwin TW (1980) "The Biochemistry of the Carotenoids." Vol. 1: "Plants." New York: Chapman and Hall, pp 203
- Gracza L, Koch H, Löffler E (1985) Isolierung von Rosmarinsäure aus *Symphytum officinale* und ihre anti-inflammatorische Wirksamkeit in einem In-vitro-Modell. Arch Pharm (Weinheim) 318:1090-1095
- Griffith F (1928) The significance of pneumococcal types. J Hyg 27:113-159
- Guidi L, Nali C, Lorenzini G, Filippi F, Soldatini GF (2001) Effect of chronic ozone fumigation on the photosynthetic process of poplar clones showing different sensitivity. Environ Pollut 113:245-254
- Guo D, Du G, Li L, Li R (2004) Inhibitory activities of rosmarinic acid against plant pathogenic fungi. Weishengwuxue Tongbao 31:71-76
- Ha JH, Kang WH, Lee JO, Cho YK, Park SK, Lee SK, Cho HK (2011) Clinical evaluation of the depigmenting effect of *Glechoma hederacea* extract by topical treatment for 8 weeks on UV-induced pigmentation in Asian skin. Eur J Dermatol 21:218-222
- Hagen SF, A. Borge GI, B. Bengtsson GB, Bilger W, Berge A, Haffner K, Solhaug KA (2007) Phenolic contents and other health and sensory related properties of apple fruit (*Malus domestica* Borkh., cv. Aroma): effect of postharvest UV-B irradiation. Postharvest Biol Technol 45:1-10
- Hager A (1969) Lichtbedingte pH-Erniedrigung in einem Chloroplasten-Kompartiment als Ursache der enzymatischen Violaxanthin/Zeaxanthin-Umwandlung; Beziehungen zur Photophosphorylierung. Planta 89:224-243
- Hager A (1980) The reversible, light-induced conversions of xanthophylls in the chloroplast. In: Pigments in Plants (Czygan, F.-C., ed.), pp. 57-79, Gustav Fischer
- Halliwell B (1996) Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? Free Radic Res 25:439-454
- Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. Plant Physiol 141:312-322
- Halpern JH (2004) Hallucinogens and dissociative agents naturally growing in the United States. Pharmacol Ther 102:131-138
- Hamaguchi T, Ono K, Murase A, Yamada M (2009) Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid-beta aggregation pathway. Am J Pathol 175:2557-2565
- Harrison L (2012) RHS Latin for gardeners. United Kingdom: Mitchell Beazley. p. 224 ISBN 9781845337315
- Häusler E, Petersen M, Alfermann AW (1991) Hydroxyphenylpyruvate reductase from cell suspension cultures of *Coleus blumei* Benth. Z Naturforsch 46c:371-376
- Häusler E, Petersen M, Alfermann AW (1992) Rosmarinsäure in *Blechnum*-Spezies. In: Haschke HP, Schnarrenberger C (eds) Botanikertagung 1992 Berlin. Akademie-Verlag, Berlin, p 507
- Häusler E, Petersen M, Alfermann AW (1993) Isolation of protoplasts and vacuoles from cell suspension cultures of *Coleus blumei* Benth. Plant Cell Rep 12:510-512
- Havaux M, Dal'Osto L, Bassi R (2007) Zeaxanthin has enhanced antioxidant capacity with respect to all other xanthophylls in *Arabidopsis* leaves and functions independent of binding to PSII antennae. Plant Physiol 145:1506-1520

- He H, Wang H, Fang C, Wu H, Guo X, Liu C, Lin Z, Lin W (2012) Barnyard grass stress up-regulates the biosynthesis of phenolic compounds in allelopathic rice. *J Plant Physiol* 169:1747-1753
- Heath RL (2008) Modification of the biochemical pathways of plants induced by ozone: What are the varied routes to change? *Environ Pollut* 155:453-463
- Heck WW, Taylor OC, Adams R, Bingham G, Miller J, Preston E, Weinstein L (1982) Assessment of crop loss from ozone. *J Air Pollut Control Assoc* 32:353-361
- Heller W, Kühnl T (1985) Elicitor induction of a microsomal 5-O-(4-coumaroyl)shikimate 3'-hydroxylase in parsley cell suspension cultures. *Arch Biochem Biophys* 241:453-460
- Herrmann K (1959) On the occurrence of tannin, oxycinnamic acid and oxycoumarin in leaf drugs in DAB 6. *Arch Pharm* 292:325-329
- Hidaka Y (2012) Disulfide-coupled protein folding: looking back, looking forward. *FEBS J* 279:2261
- Hinkle PC, Butow RA, Racker E, Chance B (1967) Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative Phosphorylation. XV Reverse Electron Transfer in the Flavin cytochrome beta region of the respiratory chain of beef heart. *J Biol Chem* 242:516-5173
- Hippeli S, Elstner EF (1996) Mechanisms of oxygen activation during plant stress: Biochemical effects of air pollutants. *J Plant Physiol* 148:249-257
- Hippolyte I, Marin B, Baccou JC, Jonard R (1992) Growth and rosmarinic acid production in cell suspension cultures of *Salvia officinalis* L. *Plant Cell Rep* 11:109-112
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207:604-611
- Hodgkin DC (1965) The x-ray analysis of complicated molecules. In: *Les Prix Nobel 1964*. Nobel Foundation, Stockholm, pp. 157-178
- Hoffmann L, Maury S, Martz F, Geoffroy P, Legrand M (2003) Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism. *J Biol Chem* 278:95-102
- Hoffmann L, Besseau S, Geoffroy P, Ritzenthaler C, Meyer D, Lapierre C, Pollet B, Legrand M (2004) Silencing of Hydroxycinnamoyl-Coenzym A Shikimate/Quinate Hydroxycinnamoyltransferase Affects Phenylpropanoid Biosynthesis. *Plant Cell* 16:1446-1456
- Hoffmann L, Besseau S, Geoffroy P, Ritzenthaler C, Meyer D, Lapierre C, Pollet B, Legrand M (2005) Acyltransferase-catalysed *p*-coumarate ester formation is a committed step of lignin biosynthesis. *Plant Biosyst* 139:50-53
- Horemans N, Asard H, Van Gestelen P, Caubers RJ (1998) Facilitated diffusion drives transport of oxidised ascorbate molecules into purified plasma membrane vesicles of *Phaseolus vulgaris*. *Physiol Plant* 104:783-789
- Hoshika Y, Watanabe M, Inada N, Koike T (2013) Model-based analysis of avoidance of ozone stress by stomatal closure in Siebold's beech (*Fagus crenata*). *Ann Bot* 112:1149-1158
- Huang B, Yi B, Duan Y, Sun L, Yu X, Guo J, Chen W (2008) Characterization and expression profiling of tyrosine aminotransferase gene from *Salvia miltiorrhiza* (Dan-shen) in rosmarinic acid biosynthesis pathway. *Mol Biol Rep* 60:1-12
- Hücherig S, Petersen M (2012) RNAi suppression and overexpression studies of hydroxyphenylpyruvate reductase (HPPR) and rosmarinic acid synthase (RAS) genes related to rosmarinic acid biosynthesis in hairy root cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 113:375-385
- Hussain MZ, Mustafa MG, Ghani QP, Bhatnagar RS (1985) Stimulation of poly(ADP-ribose) synthetase activity in the lungs of mice exposed to a low level of ozone. *Archiv Biochem Biophys* 241:477-485
- Iriti M, Rabotti G, Ascensao AD, Faoro F (2003) Benzothiadiazole induced resistance modulates ozone tolerance. *J Agric Food Chem* 51:4308-4314
- Iriti M, Faoro F (2004) Plant defense and human nutrition: the phenylpropanoids on the menu. *Curr Top Nutr Res* 2:47-95

- Iriti M, Faoro F (2009) Chemical diversity and defence metabolism: how plants cope with pathogens and ozone pollution. *Int J Mol Sci* 10:3371-3399
- IUPAC (1976) Nomenclature of cyclitols. *Biochem J* 153:23-31
- Jain M, Nijhawan A, Tyagi AK, Khurana JP (2006) Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 345:646-651
- Jakob B, Heber U (1996) Photoproduction and detoxification of hydroxyl radicals in chloroplasts and leaves in relation to photoinactivation of photosystems I and II. *Plant Cell Physiol* 37:629-635
- Jiménez A, Hernández JA, Río LA del, Sevilla F (1997) Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol* 114:275-284
- Jin Z, Xue S, Luo Y, Tian B, Fang H, Li H, Pei Y (2013) Hydrogen sulfide interacting with abscisic acid in stomatal regulation responses to drought stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* 62:41-46
- Kangasjärvi J, Jaspers P, Kollist H (2005) Signalling and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Cell Environm* 28:1021-1036
- Karib AA, Ford EF, Wilmschurst EC (1954) Studies on ethidium bromide. V. The treatment of cattle infected with resistant strains of *Trypanosoma congolense*. *J Comp Pathol* 64:187-194
- Karuppusamy S (2009) A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *J Med Plants Res* 3:1222-1239
- Kautsky H, Hirsch A (1931) Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation. *Naturwiss* 19:964
- Kautsky H, Zedlitz W (1941) Fluoreszenzkurven von Chloroplasten-Grana. *Naturwiss* 29:101-102
- Kautsky H, Apel W, Amann H (1960) Chlorophyllfluoreszenz und Kohlensäureassimilation. XIII. Die Fluoreszenzkurve und die Photochemie der Pflanze. *Biochem Zeit* 322:277-292
- Kelly FJ, Mudway I, Krishna MT, Holgate ST (1995) The free radical basis of air pollution: Focus on ozone. *Resp Med* 89:647-656
- Kempin B, Petersen M, Alfermann AW (1993) Partial purification and characterization of tyrosine aminotransferase from cell suspension cultures of *Coleus blumei*. *Planta Med* 59 Suppl.:A684
- Kendrew JC, Bodo G, Dintzis HM, Parrish RG, Wyckoff H, Phillips DC (1958) A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature* 18:1662-1666
- Kerstiens G, Lendzian KJ (1989) Interactions between ozone and plant cuticles. I. Ozone deposition and permeability. *New Phytol* 112:13-19
- Kikuzaki H, Hisamoto M, Hirose K, Akiyama K, Taniguchi H (2002) Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *J Agric Food Chem* 50:2161-2168
- Kim KH, Petersen M (2002) cDNA-cloning and functional expression of hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from cell suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant Sci* 163:1001-1009
- Kim BR, Nam HY, Kim SU, Kim SI, Chang YJ (2003) Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice. *Biotechnol Lett* 25:1869-1872
- Kim J, Song S, Lee I, Kim Y, Yoo I, Ryoo I, Bae K (2011) Anti-inflammatory activity of constituents from *Glechoma hederacea* var. *longituba*. *Bioorg Med Chem Lett* 21:3483-3487
- Kim YB, Thwe AA, Kim YJ, Li X, Kim HH, Park PB, Suzuki T, Kim SJ, Park SU (2013) Characterization of Genes for a Putative Hydroxycinnamoyl-Coenzyme A Quinate Transferase and p-Coumarate 3'-Hydroxylase and Chlorogenic Acid Accumulation in Tartary Buckwheat. *J Agric Food Chem* 61:4120-4126
- Kimura Y, Okuda H (1987) Studies on the activities of tannins and related compounds, X. Effects of caffeetannins and related compounds on arachidonate metabolism in human polymorphonuclear leukocytes. *J Nat Prod* 50:392-399

- Kishor PBK, Sangam S, Amrutha RN, Laxmi PS, Naidu K, Rao KRSS, Rao S, Reddy KJ, Theriappan P, Sreenivasulu N (2005) Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Curr Sci* 88:424-438
- Klingenberg M (1958) Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 75:376-386
- Koch-Heitzmann I, Schultze W (1988) 2000 Jahre *Melissa officinalis*. Von der Bienenpflanze zum Virustatikum. *Z Phytother* 9:77-85
- Konczak-Islam I, Okuno S, Yoshimoto M, Yamakawa O (2003) Composition of phenolics and anthocyanins in a sweet potato cell suspension culture. *Biochem Engin J* 14:155-161
- Koshland DE (1958) Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 44:98-104
- Koukol J, Conn EE (1961) The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV: Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *J Biol Chem* 236:2692-2698
- Kováts N, Áks A, Gölöncsér F, Barabás A (2011) Quantifying of bactericide properties of medicinal plants. *Plant Signal Behav* 6:777-779
- Kozai M, Sasamori E, Fujihara M, Yamashita T, Taira H, Harasawa R (2009) Growth inhibition of human melanoma cells by a recombinant arginine deiminase expressed in *Escherichia coli*. *J Vet Med Sci* 71:1343-1347
- Kremer D, Howell RK (1974) Phenylalanine ammonia lyase induced by ozone. *Proc Am Phytopath Soc* 1:152
- Kreuzer KA, Lass U, Landt O, Nitsche A, Laser J, Ellerbrok H, Pauli G, Huhn D, Schmidt CA (1999) Highly sensitive and specific fluorescence reverse transcription-PCR assay for the pseudogene-free detection of beta-actin transcripts as quantitative reference. *Clin Chem* 45:297-300
- Krupa SV, Manning WJ (1988) Atmospheric Ozone: formation and effects on vegetation. *Environ Pollut* 50:101-137
- Krupa S, McGrath MT, Andersen CP, Booker F, Burkey KO, Chappelka AH, Chevone BI, Pell EJ, Zilinskas BA (2000) Ambient ozone and plant health. *Plant Dis* 85:4-12
- Kühnl T, Koch U, Heller W, Wellmann E (1987) Chlorogenic acid biosynthesis: characterization of a light-induced microsomal 5-O-(4-coumaroyl)-D-quinic acid 3'-hydroxylase from carrot (*Daucus carota* L.) cell suspension cultures. *Arch Biochem Biophys* 258:226-232
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Laisk A, Kull O, Moldau H (1989) Ozone concentration in intercellular air spaces is close to zero. *Plant Physiol* 90:1163-1167
- Lallemant LA, McCarthy JG, McSweeney S, McCarthy AA (2012a) Purification, crystallization and preliminary x-ray diffraction analysis of a hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinic acid hydroxycinnamoyltransferase (HCT) from *Coffea canephora* involved in chlorogenic acid biosynthesis. *Acta Cryst F* 68:824-828
- Lallemant LA, Zubieta C, Lee SG, Wang Y, Acajjaoui S, Timmins J, McSweeney S, Jez JM, McCarthy JG, McCarthy AA (2012b) A structural basis for the biosynthesis of the major chlorogenic acids found in coffee. *Plant Physiol* 160:249-260
- Landmann C, Hücherig S, Fink B, Hoffmann T, Dittlein D, Coiner HA, Schwab W (2011) Substrate promiscuity of a rosmarinic acid synthase from lavender (*Lavandula angustifolia* L.). *Planta* 234:305-320
- Langebartels C, Kerner K, Leonardi S, Schraudner M, Trost M, Heller W, Sandermann H. Jr. (1991) Biochemical plant responses to ozone I: Differential induction of polyamine and ethylene biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol* 9:882-889
- Langer K, Ache P, Geiger D, Stinzinger A, Arend M, Wind C, Regan S, Fromm J, Hedrich R (2002) Poplar potassium transporters capable of controlling K⁺ homeostasis and K⁺ dependent xylogenesis. *Plant J* 32:997-1009

- Laukkanen H, Rautiainen L, Taulavuori E, Hohtola A (2000) Changes in cellular structures and enzymatic activities during browning of Scots pine callus derived from mature buds. *Tree Physiol* 20:467-475
- Lei C, Ma D, Pu G, Qiu X, Du Z, Wang H, Li G, Ye H, Liu B (2011) Foliar Application of Chitosan Activates Artemisinin Biosynthesis in *Artemisia annua* L.. *Ind Crop Prod* 1:176-182
- Leitao L, Dizengremel P, Biolley JP (2008) Foliar CO₂ fixation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) submitted to elevated ozone: Distinct changes in Rubisco and PEPc activities in relation to pigment content. *Ecotoxicol Environ Saf* 69:531-540
- Lelieveld J, Dentener F (2000) What controls tropospheric ozone? *J Geophys Res* 105: 3531-3551
- Lepelley M, Cheminade G, Tremillon N, Simkin A, Caillet V, McCarthy J (2007) Chlorogenic acid synthesis in coffee: An analysis of CGA content and real-time RT-PCR expression of HCT, HQT, C3H1, and CCoAOMT1 genes during grain development in *C. canephora*. *Plant Sci* 172:978-996
- Lindermayr C, Möllers B, Fliegmann J, Uhlmann A, Lottspeich F, Meimberg H, Ebel J (2002) Divergent members of a soybean (*Glycine max* L.) 4-coumarate:coenzyme A ligase gene family. *Eur J Biochem* 269:1304-1315
- Lissauer D, Piper KP, Moss PA, Kilby MD (2007) Persistence of fetal cells in the mother: friend or foe? *BJOG* 114:1321-5.
- Litvinenko VI, Popova TP, Simonjan AV, Zoz IG, Sokolov VS (1975) "Gerbstoffe" und Oxyzimtsäureabkömmlinge in Labiaten. *Planta Med* 27:372-380
- Loew O (1900) A new enzyme of general occurrence in organisms. *Science* 11:701-702
- Lomonte C, Sgherri C, Baker AJM, Kolev SD, Navari-Izzo F (2010) Antioxidative response of *Atriplex codonocarpa* to mercury. *Environ Exp Bot* 69:9-16
- Long SP, Farage PK, Garcia RL (1996) Measurement of leaf and canopy photosynthetic CO₂ exchange in the field. *J Exp Bot* 47:1629-1642
- Long SP, Bernacchi CJ (2003) Gas exchange measurements, what can they tell us about underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *J Exp Bot* 54:2392-2401
- Loreto F, Pinelli P, Manes F, Kollist H (2004) Impact of ozone on monoterpene emissions and evidence for an isoprene-like antioxidant action of monoterpenes emitted by *Quercus ilex* leaves. *Tree Physiol* 24:361-367
- Loschen G, Azzi A, Richter C, Flohe L (1974) Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett* 42:68-72
- Lü S, Fan Y, Liu L, Liu S, Zhang W and Meng Z (2010) Ectopic expression of TrPI, a *Taihangia rupestris* (Rosaceae) PI ortholog, causes modifications of vegetative architecture in *Arabidopsis*. *J Plant Physiol* 167:1613-1621
- Lukmanul Hakkim F, Kalyani S, Essa M, Girija S, Song H (2011) Production of rosmarinic in *Ocimum sanctum* cell cultures by the influence of sucrose, phenylalanine, yeast extract, and methyl jasmonate. *Int J Biol Med Res* 2:1070-1074
- Luo H, Chen S, Jiang J, Teng N, Chen Y, Chen F (2012) The AP2-like gene NsAP2 from water lily is involved in floral organogenesis and plant height. *J Plant Physiol* 169:992-998
- Ma X, Koepke J, Panjikar S, Fritzsche G, Stöckigt J (2005) Crystal structure of vinorine synthase, the first representative of the BAHD superfamily. *J Biol Chem* 280:13576-13583
- MacAlister ED, Myers J (1940) The time course of photosynthesis and fluorescence observed simultaneously. *Smithson Misc Collect* 99:1-37
- Maccarrone M, Veldink GA, Vliegthart JFG, Finazzi Agrò A (1997) Ozone stress modulates amine oxidase and lipoxygenase expression in lentil (*Lens culinaris*) seedlings. *FEBS Lett* 408:241-244
- Madkour SA, Laurence JA (2002) Egyptian plant species as new ozone indicators. *Environ Pollut* 120:339-353
- Mahesh V, Million-Rousseau R, Ullmann P, Chabrillange N, Bustamante J, Mondolot L, Morant M, Noirot M, Hamon S, de Kochko A, Werck-Reichhart D, Campa C (2007)

- Functional characterization of two p-coumaroyl ester 3'-hydroxylase genes from coffee tree: evidence of a candidate for chlorogenic acid biosynthesis. *Plant Mol Biol* 64:145-159
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jimenez L (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79:727-747
- Manninen AM, Holopainen T, Lyytikäinen BP, Holopainen JK (2000) The role of low-level ozone exposure and mycorrhizas in chemical quality and insect herbivore performance on Scots Pine seedlings. *Glob Change Biol* 6:111-121
- Martins EN, Pessano NT, Leal L, Roos DH, Folmer V, Puntel GO (2012) Protective effect of *Melissa officinalis* aqueous extract against Mn-induced oxidative stress in chronically exposed mice. *Brain Res Bull* 87:74-79
- Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J Exp Bot* 51:659-668
- May MJ, Vernoux T, Leaver C, van Montagu M, Inzé D (1998) Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *J Exp Bot* 49:649-667
- McCarty M, Avery OT (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of the pneumococcal types. *J Exp Med* 79:137-158
- McKee IF, Eiblmeier M, Polle A (1997) Enhanced ozone-tolerance in wheat grown at an elevated CO₂ concentration: ozone exclusion and detoxification. *New Phytol* 137:275-284
- Menin B, Comino C, Moglia A, Dolzhenko Y, Portis E, Lanteri S (2010) Identification and mapping of genes related to caffeoylquinic acid synthesis in *Cynara cardunculus* L. *Plant Sci* 179:338-347
- Merfort I (1992) Caffeoylquinic acids from flowers of *Arnica montana* and *Arnica chamissonis*. *Phytochemistry* 31:2111-2113
- Mhamdi A, Queval G, Chaouch S, Vanderauwera S, Van Breusegem F, Noctor G (2010) Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *J Exp Bot* 61:4197-4220
- Miladi B, Bouallagui H, Dridi C, El Marjou A, Boeuf G, Di Martino P, Dufour F, Elm'Selmi A (2011) A new tagged-TEV protease: Construction, optimization of production, purification and test activity. *Protein Expr Purif* 75:75-82
- Milovanovic M, Zivkovic D, Vucelic-Radovic B (2010) Antioxidant effects of *Glechoma hederacea* as a food additive. *Nat Prod Commun* 5:61-63
- Mishra AK, Rai R, Agrawal SB (2013) Individual and interactive effects of elevated carbon dioxide and ozone on tropical wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars with special emphasis on ROS generation and activation of antioxidant defence system. *Indian J Biochem Biophys* 50:139-149
- Mitsuhara I, Malik KA, Miura M, Ohashi Y (1999) Animal cell-death suppressors Bcl-xL and Ced-9 inhibit cell death in tobacco plants. *Curr Biol* 9:775-778
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7:405-410
- Moffatt BA, Studier FW (1987) T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. *Cell* 49:221-227
- Mohanty JG, Jaffe JS, Schulman ES, Raible DG (1997) A highly sensitive fluorescent micro-assay of H₂O₂ release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative. *J Immunol Meth* 202:133-141
- Mølgaard P, Ravn H (1988) Evolutionary aspects of caffeoyl ester distribution in dicotyledons. *Phytochemistry* 27:2411-2421
- Møller IM, Jensen PE, Hansson A (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu Rev Plant Biol* 58:459-481
- Mudd JB, Leavitt R, Ongun A, McManus TT (1969) Reaction of ozone with amino acids and proteins. *Atmos Environ* 3:669-682
- Mülhardt C (2009) "Der Experimentator: Molekularbiologie." 6. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg
- Müller P, Li XP, Niyogi KK (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol* 125:1558-1566

- Murrill WA, Horton PB, Leiberman E, Newburgh LH (1941) Vitamin A and carotene metabolism in diabetics and normals. *J Clin Invest* 20:395
- Mustafa MG (1990) Biochemical basis of ozone toxicity. *Free Radical Biol Med* 9:245-265
- Nagendra-Prasad D, Sudhakar N, Murugesan K, Mohan N (2008) Pre-exposure of calli to ozone promotes tolerance of regenerated *Lycopersicon esculentum* cv. PKM1 plantlets against acute ozone stress. *J Plant Physiol* 165:1288-1299
- Nali C, Paoletti E, Marabottini R, Della Rocca G, Lorenzini G, Paolacci AR, Ciaffi M, Badiani M (2004) Ecophysiological and biochemical strategies of response to ozone in Mediterranean evergreen broadleaf species. *Atmos Environ* 38:2247-2257
- Nardini M, Cirillo E, Natella F, Scaccini C (2002) Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *J Agric Food Chem* 50:5735-5741
- Nassar SA, El-Ahmady SH, Nassar AH, Al-Azizi MM (2013) Studying the Possible Biotransformation of the Cytotoxic Diterpenoid Paclitaxel Using *Jatropha Curcas* Cell Suspension Culture. *Eur J Med Plants* 3:241-253
- Neill SJ, Desikan R, Hancock J (2002) Hydrogen peroxide signalling. *Curr Opin Plant Biol* 5:388-395
- Ness AR, Powles JW (1997) Fruit and vegetables and cardiovascular disease: A review. *Int J Epidemiol* 26:1-13
- Newton RJ (1977) Abscissic acid effects on fronds and roots of *Lema minor* L. *Am J Bot* 64:45-49
- Nicot N, Hausman JF, Hoffmann L, Evers D (2005) Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J Exp Bot* 56:2907-2914
- Niegowski SJ (1953) Destruction of phenols by oxidation with ozone. *Industr Eng Chem* 45:632-634
- Niggeweg R, Michael A, Martin C (2004) Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nature Biotechnol* 22:746-754
- Niki E (1991) Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. *Am J Clin Nutr* 54:1119S-1124S
- Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:249-279
- Noctor G (2006) Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant Cell Environ* 29:409-425
- Noormets A, Sober A, Pell EJ, Dickson RE, Podila GK, Sober J, Isebrands JG, Karnosky DF (2001) Stomatal and non-stomatal limitation to photosynthesis in two trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.) clones exposed to elevated CO₂ and O₃. *Plant Cell Environ* 24:327-336
- Novak K, Schaub M, Fuhrer J, Skelly JM, Hug C, Landolt W, Bleuler P, Kräuchi N (2005) Seasonal trends in reduced leaf gas exchange and ozone induced foliar injury in three ozone sensitive woody plant species. *Environ Poll* 136:33-45
- Oh M, Trick HN, Rajashekar CB (2009) Secondary metabolism and antioxidants are involved in environmental adaption and stress tolerance in lettuce. *J Plant Physiol* 166:180-191
- Oksanen E, Sôber J, Karnosky DF (2001) Interactions of elevated CO₂ and ozone in leaf morphology of aspen (*Populus tremuloides*) and birch (*Betula papyrifera*) in aspen FACE experiment. *Environ Poll* 115:437-446
- Olbrich M, Gerstner E, Welzl G, Fleischmann F, Osswald W, Bahnweg G, Ernst D (2008) Quantification of mRNAs and housekeeping gene selection for quantitative real-time RT-PCR normalization in European beech (*Fagus sylvatica* L) during abiotic and biotic stress. *Z Naturforsch* 63c:574-582
- Oliveira AB, Moura CFH, Gomes-Filho E, Marco CA, Urban L, Miranda MRA (2013) The impact of organic farming on quality of tomatoes is associated to increased oxidative stress during fruit development. *PLoS One* 8:e56354
- Onandia G, Olsson AK, Barth S, King JS, Uddling J (2011) Exposure to moderate concentrations of tropospheric ozone impairs tree stomatal response to carbon dioxide. *Environ Poll* 159:2350-2354

- Ornstein L (1964) Disc electrophoresis I. background and theory. *Ann NY Acad Sci* 121:321-349
- Overmyer K, Kollist H, Tuominen H (2008) Complex phenotypic profiles leading to ozone sensitivity in *Arabidopsis thaliana* mutants. *Plant Cell Environ* 31:1237-1249
- Pääkkönen E, Günthardt-Goerg MS, Halopainen T (1998) Responses of leaf processes in a sensitive birch (*Betula pendula* Roth) clone to ozone combined with drought. *Ann Bot* 82:49-59
- Paiva S, Russell R (1999) Beta carotene and other carotenoids as antioxidants. *J Am Coll Nutr* 18:426-33
- Paolacci AR, D'Ovidio R, Marabottini R, Nali C, Lorenzini G, Abenavoli MR, Badiani M (2001) Ozone induces a differential accumulation of phenylalanine ammonia-lyase, chalcone synthase and chalcone isomerase RNA transcripts in sensitive and resistant bean cultivars. *Aust J Plant Physiol* 28:425-428
- Paoletti E, Contran N, Bernasconi P, Günthardt-Goerg MS, Vollenweider P (2009) Structural and physiological responses to ozone in Manna ash (*Fraxinus ornus* L.) leaves of seedlings and mature trees under controlled and ambient conditions. *Sci Total Environ* 407:1631-1643
- Pardo Torre JC, Schmidt GW, Paetz C, Reichelt M, Schneider B, Gershenzon J, D'Auria JC (2013) The biosynthesis of hydroxycinnamoyl quinate esters and their role in the storage of cocaine in *Erythroxylum coca*. *Phytochemistry* 91:177-186
- Parnham MJ, Kesselring K (1985) Rosmarinic acid. *Drugs Fut* 10:756-757
- Pasqualini S, Batini P, Ederli I, Porceddu A, Piccioni C, De Marchis F, Antonielli M (2001) Effects of short-term ozone fumigation on tobacco plants: response of the scavenging system and expression of the glutathione reductase. *Plant Cell Environ* 24:245-252
- Pasqualini S, Piccioni C, Reale L, Ederli L, Della Torre G, Ferranti F (2003) Ozone-induced cell death in tobacco cultivar Bel W3 plants. The role of programmed cell death in lesion formation. *Plant Physiol* 133:1122-1134
- Pasqualini S, Reale L, Calderini O, Pagiotti R, Ederli L (2012) Involvement of protein kinases and calcium in the NO-signaling cascade for defence-gene induction in ozonated tobacco plants. *J Exp Bot* 63:4485-4496
- Patra AK, Mukhopadhyay R, Mukhija R, Krishnan A, Garg LC, Panda AK (2000) Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 18:182-192
- Payen (1846) Untersuchung des Kaffees. *Annalen* 60:286-294
- Payen (1846) Memoire sur le café (3^o Part). *Comptes Rendus* 23:244-251
- Pedersen JA (2000) Distribution and taxonomic implications of some phenolics in the family Lamiaceae determined by ESR spectroscopy. *Biochem Syst Ecol* 28:229-253
- Pell EJ, Pearson NS (1983) Quantity of RuBP-carboxylase in three cultivars of alfalfa stressed by O₃. *Phytopathol* 73:372
- Pellegrini E, Francini A, Lorenzini G, Nali C (2011a) PSII photochemistry and carboxylation efficiency in *Liriodendron tulipifera* under ozone exposure. *Environ Exp Bot* 70:217-226
- Pellegrini E, Carucci MG, Campanella A, Lorenzini G, Nali C (2011b) Ozone stress in *Melissa officinalis* plants assessed by photosynthetic function. *Environ Exp Bot* 73:94-101
- Pellegrini E, Trivellini A, Campanella A, Francini A, Lorenzini G, Nali C, Vernieri P (2013) Signaling molecules and cell death in *Melissa officinalis* plants exposed to ozone. *Plant Cell Rep DOI* 10.1007/s00299-013-1508-0
- Perata P, Picciarelli P, Alpi A (1990) Pattern of variations in abscisic acid content in suspensors, embryos, and integuments of developing *Phaseolus coccineus* seeds. *Plant Physiol* 94:1776-1780
- Petersen M, Alfermann AW (1988) Two new enzymes of rosmarinic acid biosynthesis from cell cultures of *Coleus blumei*: hydroxyphenylpyruvate reductase and rosmarinic acid synthase. *Z Naturforsch* 43c:501-504
- Petersen MS (1991) Characterization of rosmarinic acid synthase from cell cultures of *Coleus blumei*. *Phytochemistry* 30:2877-2881

- Petersen M, Häusler E, Karwatzki B, Meinhard J (1993) Proposed biosynthetic pathway for rosmarinic acid in cell cultures of *Coleus blumei* Benth. *Planta* 189:10-14
- Petersen M, Häusler E, Meinhard J, Karwatzki B, Gertlowski C (1994) The biosynthesis of rosmarinic acid in suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 38:171-179
- Petersen M (1997) Cytochrome P-450-dependent hydroxylation in the biosynthesis of rosmarinic acid in *Coleus*. *Phytochemistry* 45:1165-1172
- Petersen M, Simmonds MS (2003) Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 62:121-125
- Petersen M, Abdullah Y, Benner J, Eberle D, Gehlen K, Hücherig S, Janiak V, Kim KH, Sander M, Weitzel C, Wolters S (2009) Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry* 70:1663-1679
- Petersen M, Matern U (2010) Biosynthesis of phenylpropanoids and related compounds. In: Wink M (ed) *Annual plant reviews – Biochemistry of plant secondary metabolism*. Wiley-Blackwell, Chichester, pp 182-257
- Petersen M (2013) Rosmarinic acid: new aspects. *Phytochem Rev* 12:207-227
- Pfaffl MW, Vandesompele J, Kubista M (2009) Data analysis software. In: Logan J, Edwards K, Saunders N, editors. *Real-time PCR: Current Technology and Applications*. Norfolk: Caister Academic Press, pp 65-84
- Plumb GW, Garcia-Conesa MT, Kroon PA, Rhodes M, Ridley S, Williamson G (1999) Metabolism of chlorogenic acid by human plasma, liver, intestine and gut microflora. *J Sci Food Agric* 79:390-392
- Pokalsky AR, Hiatt WR, Ridge N, Rasmussen R, Houck CM, Shewmaker CK (1989) Structure and expression of elongation factor 1 alpha in tomato. *Nucleic Acids Res* 17:4661-4673
- Polle A, Wieser G, Havranek WM (1995) Quantification of ozone flux and apoplastic ascorbate content in needles of Norway spruce trees (*Picea abies* L., Karst) at high altitude. *Plant Cell Environ* 18:681-688
- Prior RL, Wu X, Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53:4290-4302
- Pryor WA (1986) Oxy-radicals and related species: Their formation, lifetimes, and reactions. *Annu Rev Physiol* 48:657-667
- Pryor WA, Church DF (1991) Aldehydes, hydrogen peroxide and organic radicals as mediators of ozone toxicity. *Free Rad Biol Med* 11:41-46
- Qi J, Yu S, Zhang F, Shen X, Zhao X, Yu Y, Zhang D (2010) Reference gene selection for real-time quantitative polymerase chain reaction of mRNA transcript levels in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.ssp. *pekinensis*). *Plant Mol Biol Rep* 28:597-604
- Qiao Z, Koizumi Y, Zhang M, Natsui M, Flores MJ, Gao L, Yusa K, Koyota S, Sugiyama T (2012) Anti-melanogenesis effect of *Glechoma hederacea* L. extract on B16 murine melanoma cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 76:1877-1883
- Rabinowitch EI (1945) Ascorbic acid in green plants. I. Ascorbic acid in the chloroplasts. In: *Photosynthesis, vol. 1: Chemistry of photosynthesis, chemosynthesis and related processes in vitro and in vivo*, Interscience Publishers, Inc New York, pp. 269-271
- Ranieri A, Petacco F, Castagna A, Soldatini GF (2000) Redox state and peroxidase system in sunflower plants exposed to ozone. *Plant Sci* 159:159-167
- Rao MV, Hale BA, Ormrod DP (1995) Amelioration of ozone-induced oxidative damage in wheat plants grown under high carbon dioxide. *Plant Physiol* 109:421-432
- Rautenkranz AAF, Li L, Machler F, Martinoia E, Oertli JJ (1994) Transport of ascorbic acid and dehydroascorbic acid across protoplast and vacuole membranes isolated from barley (*Hordeum vulgare* L. cv Gerbel). *Plant Physiol* 106:187-193
- Raymond J, Segre D (2006) The effect of oxygen on biochemical networks and the evolution of complex life. *Science* 311:1764-1767
- Razzaque A, Ellis BE (1977) Rosmarinic acid production in *Coleus* cell cultures. *Planta* 137:287-291

- Regelsberger G, Jakopitsch C, Plasser L, Schwaiger H, Furtmüller PG, Peschek GA, Zámocký M, Obinger C (2002) Occurrence and biochemistry of hydroperoxidase in oxygenic phototrophic prokaryotes (cyanobacteria). *Plant Physiol Biochem* 40:479-490
- Rehm H, Letzel T (2010) „Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics.“ 6. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg
- Reich PB (1983) Effects of low concentrations of O₃ on net photosynthesis, dark respiration, and chlorophyll contents in aging hybrid poplar leaves. *Plant Physiol* 73:291-296
- Reid KE, Olsson N, Schlosser J, Peng F, Lund ST (2006) An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biol* 6:27
- Reinhard E (2001) Pharmazeutische Biologie, 6. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart
- Rettschlag J (2003) Linksventrikuläre Expression verschiedener Housekeeping-Gene bei kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin
- Rhodes MJC, Woollorton LSC (1976) The enzymatic conversion of hydroxycinnamic acids to *p*-coumaroyl quinic and chlorogenic acids in tomato. *Phytochemistry* 15:947-951
- Rice-Evans CA, Miller J, Paganga G (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* 2:152-159
- Richet N, Tozo K, Afif D, Banvoy J, Legay S, Dizengremel P, Cabané M (2012) The response to daylight or continuous ozone on phenylpropanoid and lignin biosynthesis pathways in poplar differs between leaves and wood. *Planta* 236:727-737
- Robiquet, Boutron (1837) Ueber den Kaffee. *Ann Pharmacie* 23:93-95
- Rogers R (2008) *Coleus* - Rainbow Foliage for Containers and Gardens. Timber Press, Portland, Oregon
- Rogers SO, Bendich AJ (1985) Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified tissues. *Plant Mol Biol* 5:69-76
- Rohacek K (2002) Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning and mutual relationships, *Photosynthetica* 40:13-29
- Rout GR, Samantaray S, Das P (2000) In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnol Adv* 18:91-120
- Rose TM, Henikoff JG, Henikoff S (2003) CODEHOP (COnsensus- DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design. *Nucleic Acids Res* 31:3763-3766
- Rowland F (2006) Stratospheric ozone depletion. *Philos T Roy Soc B* 361:769-790
- Rozpądek P, Slesak I, Cebula S, Waligórski P, Dziurka M, Skoczowski A, Miszański Z (2013) Ozone fumigation results in accelerated growth and persistent changes in the antioxidant system of *Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *alba*. *J Plant Physiol* 170:1259-1266
- Rubin MB (2001) The history of ozone. The Schönbein period, 1839–1868. *Bull Hist Chem* 26:40–56
- Ruch W, Cooper PH, Baggiolini M (1983) Assay of H₂O₂ production by macrophages and neutrophils with homovanillic acid and horseradish peroxidase. *J Immunol Meth* 63:347-357
- Ryle AP, Anfinsen CB (1957) Studies on the disulfide bridges in ribonuclease. *Biochim Biophys Acta* 24:633-635
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354
- Sakalauskaitė J, Brazaitytė A, Urbonavičiūtė A, Samuolienė G, Šabajevienė G, Sakalauskienė S, Duchovskis P (2010) Radish plant behaviour under short-term elevated ozone fumigation. *Cent Eur J Biol* 5:674-681
- Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H, (2002) Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* 177:67-80
- Salin ML (1987) Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiol Plant* 72:681-689

- Samaras Y, Bressan RA, Csonka LN, Marcía-Ríos MG, Paino D, Urzo M, Rhodes D, Proline accumulation during drought and salinity, in: N. Smirnoff (Ed.), *Environment and Plant Metabolism*, Bios Scientific Publishers, Oxford, 1995, pp. 161-187
- Sánchez-Campillo M, Gabaldon JA, Castillo J, Benavente-García O, Del Baño MJ, Alcaraz M, Vicente V, Alvarez N, Lozano JA (2009) Rosmarinic acid, a photo-protective agent against UV and other ionizing radiations. *Food Chem Toxicol* 47:386-392
- Sander M (2010) Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen von Hydroxycinnamoyltransferasen aus *Coleus blumei* und *Glechoma hederacea*. Dissertation, Philipps-Universität Marburg
- Sander M, Petersen M (2011) Distinct substrate specificities and unusual substrate flexibilities of two hydroxycinnamoyl transferases, rosmarinic acid synthase and hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate hydroxycinnamoyltransferase, from *Coleus blumei* Benth. *Planta* 233:1157-1171
- Saviranta NMM, Julkunen-Tiitto R, Oksanen E, Karjalainen RO (2010) Leaf phenolic compounds in red clover (*Trifolium pratense* L.) induced by exposure to moderately elevated ozone. *Environ Poll* 158:440-446
- Scalbert A, Williamson G (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130:2073S-2085S
- Scalbert A, Morand C, Manach C, Rémésy C (2002) Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacother* 56:276-282
- Scarpati ML, Oriente G (1958) Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal rosmarinus off.). *Ric Sci* 28:2329-2333
- Scebba F, Soldatini G, Ranieri A (2003) Ozone differentially affects physiological and biochemical responses of two clover species; *Trifolium repens* and *Trifolium pratense*. *Environ Poll* 123:209-216
- Schönbein CF (1840) "On the Odour Accompanying Electricity and on the Probability of its Dependence on the Presence of a New Substance." *Philos Mag* 17:293-294
- Schreiber U, Schliwa U, Bilger W (1986) Continuous recording of photochemical and non photochemical quenching with a new type of modulation fluorimeter. *Photosynth Res* 10:51-62
- Schultes RE, Hofmann A (1992) *Plants of the Gods: Their Sacred, Healing and Hallucinogenic Powers*. Rochester, VT: Healing Arts Press.
- Scotto-Lavino E, Du G, Frohman MA (2006a) 3' end cDNA amplification using classic RACE. *Nat Protoc* 1:2742-2745.
- Scotto-Lavino E, Du G, Frohman MA (2006b) 5' end cDNA amplification using classic RACE. *Nat Protoc* 1:2555-2562
- Segasothy M, Phillips PA (1999) Vegetarian diet: panacea for modern lifestyle diseases? *Q J Med* 92:531-544
- Serazin-Leroy V, Denis-Henriot D, Morot M, de Mazancourt P, Giudicelli Y (1998) Semi-quantitative RT-PCR for comparison of mRNAs in cells with different amounts of housekeeping gene transcripts. *Mol Cell Probes* 12:283-291
- Setiawan AN, Lokman PM (2010) The use of reference gene selection programs to study the silvering transformation in a freshwater eel *Anguilla australis*: a cautionary tale. *BMC Mol Biol* 11:75
- Sgarbi E, Fornasiero RB, Lins AP, Bonatti PM (2003) Phenol metabolism is differentially affected by ozone in two cell lines from grape (*Vitis vinifera* L.) leaf. *Plant Sci* 165:951-957
- Shadle G, Chen F, Reddy MSS, Jackson L, Nakashima J, Dixon RA (2007) Down-regulation of hydroxycinnamoyl CoA:shikimate hydroxycinnamoyl transferase in transgenic alfalfa affects lignification, development and forage quality. *Phytochemistry* 68:1521-1529
- Shao HB, Chu LY, Shao MA, Jaleel CA, Mi HM (2008) Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *C R Biol* 331:433-441
- Shapiro M, Salamouny S El, Shepard BM, Jackson DM (2009b) Plant phenolics as radiation protectants for the beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus. *J Agric Urban Entomol* 26:1-10
- Sharkey TD (1985) Photosynthesis in intact leaves of C3 plants: physics, physiology and rate

- limitations. *Bot Rev* 51:53-105
- Sharma YK, Davis KR (1994) Ozone-induced expression of stress-related genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 105:1089-1096
- Sheard LB, Zheng N (2009) Signal advance for abscisic acid. *Nature* 462:575-576
- Shiga T, Shoji K, Shimada H, Hashida SN, Goto F, Yoshihara T (2009) Effect of light quality on rosmarinic acid content and antioxidant activity of sweet basil, *Ocimum basilicum* L.. *Plant Biotechnol* 26:255-259
- Shin R, Berg RH, Schachtman DP (2005) Reactive oxygen species and root hairs in *Arabidopsis* root response to nitrogen, phosphorus and potassium deficiency. *Plant Cell Physiol* 46:1350-1357
- Silva RR, Camara CAG, Almeida AV, Ramos CS (2012) Biotic and abiotic stress induced phenylpropanoids in leaves of the mango (*Mangifera indica* L., Anacardiaceae). *J Brazil Chem Soc* 23:206-211
- Silveira ED, Alves-Ferreira M, Guimarães LA, Silva FR, Carneiro VTC (2009) Selection of reference genes for quantitative real-time PCR expression studies in the apomictic and sexual grass *Brachiaria brizantha*. *BMC Plant Biol* 9:84
- Singleton VL, Rossi JAJ (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16:144-158
- Sitch S, Cox PM, Collins WJ, Huntingford C (2007) Indirect radiative forcing of climate change through ozone effects on the land-carbon sink. *Nature* 448:791-795
- Sitte P, Weiler EW, Kadereit JW, Bresinsky A, Körner C (2002) Strasburger, 35. Auflage Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin
- Slavkovska V, Jancic R, Milosavljevic S, Djokovic D (1997) Variability of the essential oil composition of the species *Satureja montana* L. (Labiatae). *J Essent Oil Res* 9:629-634
- Smith HO, Nathans D (1973) Nomenclature for restriction enzymes. *J Mol Biol* 81:419-423
- Šnrychová I, Ayaydin F, Hideg E (2009). Detecting hydrogen peroxide in leaves in vivo - A comparison of methods. *Physiol Plant* 135:1-18
- Soldatini GF, Lorenzini G, Filippi F, Nali C, Guidi L (1998) Photosynthesis of two poplar clones under long-term exposure to ozone. *Physiol Plantarum* 104:707-712
- Somers GL, Chappelka AH, Rosseau P, Renfro JR (1998). Empirical evidence of growth decline related to visible ozone injury. *Forest Ecol Manag* 104:129-137
- Sonnante G, D'Amore R, Blanco E, Pierri CL, De Palma M, Luo J, Tucci M, Martin C (2010) Novel hydroxycinnamoyl-coenzyme A quinate transferase genes from artichoke are involved in the synthesis of chlorogenic acid. *Plant Physiol* 153:1-15
- Soret JL (1865) Recherches sur la densité de l'ozone. *C R Hebd Seances Acad Sci, Ser C*, 61:941
- Staheli JP, Boyce R, Kovarik D, Rose TM (2011) CODEHOP PCR and CODEHOP PCR Primer Design. *Meth Mol Biol* 687:57-73
- Stahl E (1888) Pflanzen und Schnecken. *Jenaische Zeitschrift f. Naturwissenschaften* 22:557-684
- Stewart GR, Smith H (1972) Effects of abscisic acid on nucleic acid synthesis and the induction of nitrate reductase in *Lemna polyrrhiza*. *J Exp Bot* 23:875-885
- Stöckigt J, Zenk MH (1974) Enzymatic synthesis of chlorogenic acid from caffeoyl coenzyme A and quinic acid. *FEBS Lett* 42:131-134
- Stöckigt J, Zenk MH (1975) Chemical syntheses and properties of hydroxycinnamoyl-coenzyme A derivatives. *Z Naturforsch* 30c:352-358
- St Pierre B, De Luca V (2000) Evolution of acyltransferase genes: origin and diversification of the BAHD superfamily of acyltransferases involved in secondary metabolism. *Rec Adv Phytochem* 34:285-315
- Studier FW, Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189:113-130
- Stürzenbaum SR, Kille P (2001) Control genes in quantitative molecular biological techniques: the variability of invariance. *Comp Biochem Physiol B* 130:281-289

- Suhandono S, Hughes J, Brown K, Hughes MA (2001) Expression and structure of an elongation factor-1 α gene (MeEF1) from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Euphytica 120:49-58
- Sumaryono W, Proksch P, Hartmann T, Nimtz M, Wray V (1991) Induction of rosmarinic acid accumulation in cell suspension cultures of *Orthosiphon aristatus* after treatment with yeast extract. Phytochemistry 30:3267-3271
- Summerfelt ST, Hochheimer JN (1997) Review of ozone processes and applications as an oxidizing agent in aquaculture. Prog Fish-Cult 59:94-105
- Sumner JB (1927) Textbook of biological chemistry. Macmillan, New York
- Sun H, Li Y, Feng S, Zou W, Guo K, Fan C, Si S, Peng L (2013) Analysis of five rice 4-coumarate:coenzyme A ligase enzyme activity and stress response for potential roles in lignin and flavonoid biosynthesis in rice. Biochem Biophys Res Commun 430:1151-1156
- Sunnen GV (1988) Ozone in Medicine: Overview and Future Directions. J. Adv. Med. 1: 159-174
- Sutherland MW (1991) The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. Physiol Mol Plant Pathol 39:79-93
- Syklowska-Baranek K, Pietrosiuk A, Naliwajski MR, Kawiak A, Jeziorek M, Wyderska S, Łojkowska E, Chinou I (2012) Effect of L-phenylalanine on PAL activity and production of naphthoquinone pigments in suspension cultures of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. In Vitro Cell Dev Biol Plant 48:555-564
- Szabados L, Savoure A (2010) Proline: a multifunctional amino acid. Trends Plant Sci 15:89-97
- Szabo E, Thelen A, Petersen M (1999) Fungal elicitor preparations and methyl jasmonate enhance rosmarinic acid accumulation in suspension cultures of *Coleus blumei*. Plant Cell Rep 18:485-489
- Takahama U, Hirotsu M, Oniki T (1999) Age-dependent changes in levels of ascorbic acid and chlorogenic acid, and activities of peroxidase and superoxide dismutase in the apoplast of tobacco leaves: mechanism of the oxidation of chlorogenic acid in the apoplast. Plant Cell Physiol 40:716-724
- Takeda R, Hasegawa J, Shinozaki M (1990) The first isolation of lignans, megacerotonic acid and anthocerotonic acid, from non-vascular plants, Anthocerotae (hornworts). Tetrahedron Lett 31:4159-4162
- Tamagnone L, Merida A, Stacey N, Plaskitt K, Parr A, Chang CF, Lynn D, Dow JW, Roberts K, Martin C (1998) Inhibition of phenolic acid metabolism results in precocious cell death and altered cell morphology in leaves of transgenic tobacco plants. Plant Cell 10:1801-1816
- Tang Y, Chevone BI, Hess JL (1999) Ozone-responsive proteins in a tolerant and sensitive clone of white clover (*Trifolium repens*). Environ Pollut 104:89-98
- Tarpley MM, Wink DA, Grisham MB (2004) Methods for detection of reactive Metabolites of Oxygen and Nitrogen: in vitro and in vivo considerations. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 286:R431-R444
- Tenhunen J, Yocum C, Gates D (1976) Development of a photosynthesis model with an emphasis on ecological applications. I. Theory, Oecologia 26:69-100
- Teraoka M, Nakaso K, Kusumoto C, Katano S, Tajima N, Yamashita A, Zushi T, Ito S, Matura T (2012) Cytoprotective effect of chlorogenic acid against α -synuclein-related toxicity in catecholaminergic PC12 cells. J Clin Biochem Nutr 51:122-127
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. J Biotechnol 75:291-295
- Thomas C, Meyer D, Wolff M, Himber C, Alioua M, Steinmetz A (2003) Molecular characterization and spatial expression of the sunflower ABP1 gene. Plant Mol Biol 52:1025-1036
- Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wie Y, Collinge DB (1997) Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. Plant J 11:1187-1194

- Tintelnot S (2006) Der Einfluss von Abscisinsäure auf die pflanzliche Zellwand: Untersuchung extrazellulärer Proteine beim Laubmoos *Physcomitrella patens*. Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg im Breisgau
- Tsuchiya J, Yamada T, Niki E, Kamiya Y (1985) Interaction of galvinoxyl radical with ascorbic acid, cysteine and glutathione in homogeneous solution and in aqueous dispersions. *Bull Chem Soc Jpn* 58:326-330
- Tuan PA, Park WT, Xu H, Park NI, Park SU (2012) Accumulation of tilianin and rosmarinic acid and expression of phenylpropanoid biosynthetic genes in *Agastache rugosa*. *J Agric Food Chem* 60:5945-5951
- Ulbrich B, Zenk MH (1979) Partial purification and properties of hydroxycinnamoyl-CoA: quinate hydroxycinnamoyl transferase from higher plants. *Phytochemistry* 18:929-933
- Ulbrich B, Wiesner W, Arens H (1985) Large-scale production of rosmarinic acid from plant cell cultures of *Coleus blumei* Benth. In: Neumann KH, Barz W, Reinhard E (eds) Primary and secondary metabolism of plant cell cultures. Springer, Berlin, pp 293-303
- Umezawa T (2010) The cinnamate/monolignol pathway. *Phytochem Rev* 9:1-17
- Ursin VM, Irvine JM, Hiatt WR, Shewmaker CK (1991) Developmental analysis of elongation factor-1 alpha expression in transgenic tobacco. *Plant Cell* 3:583-591
- Vahisalu T, Kollist H, Wang YF, Nishimura N, Chan WY, Valerio G, Lamminmaki A, Brosche M, Moldau H, Desikan R, Schroeder JI, Kangasjarvi J (2008) SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* 452:487-491
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of realtime quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:RESEARCH0034
- Vernieri P, Perata P, Bugnoli M, Presentini R, Lorenzi R, Ceccarelli N, Alpi A, Tognoni F (1989) Solid phase radioimmunoassay for the quantitation of abscisic acid in plant crude extracts using a new monoclonal antibody. *J Plant Physiol* 134:441-446
- Verpoorte R, Contin A, Memelink J (2002) Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochem Rev* 1:13-25
- Villegas RJA, Kojima M (1986) Purification and characterization of Hydroxycinnamoyl D-Glucose/Quinate hydroxycinnamoyl transferase in the root of sweet potato, *Ipomoea batatas* Lam. *J Biol Chem* 261:8729-8733
- Vogt T (2010) Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant* 3:2-20
- Vokou D, Kokkini S, Bessiere JM (1993) Geographic variations of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) essential oils. *Biochem Syst Ecol* 21:287-295
- Von Caemmerer S, Farquhar GD (1981) Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153:376-387
- Vranová, E, Inzé D, Van Breusegem F (2002) Signal transduction during oxidative stress. *J Exp Bot* 53:1127-1236
- Vuković R, Bauer N, Curković-Perica M (2013) Genetic elicitation by inducible expression of β -cryptogein stimulates secretion of phenolics from *Coleus blumei* hairy roots. *Plant Sci* 199-200:18-28
- Wagg S, Mills G, Hayes F, Wilkinson S, Davies WJ (2013) Stomata are less responsive to environmental stimuli in high background ozone in *Dactylis glomerata* and *Ranunculus acris*. *Environ Pollut* 175:82-91
- Wagner A, Ralph J, Akiyama T, Flint H, Phillips L, Torr K, Nanayakkara B, Te Kiri L (2007) Exploring lignification in conifers by silencing hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate hydroxycinnamoyltransferase in *Pinus radiata*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:11856-11861
- Walker AM, Hayes RP, Youn B, Vermerris W, Sattler SE, Kang C (2013) Elucidation of the structure and reaction mechanism of Sorghum hydroxycinnamoyltransferase and its structural relationship to other coenzyme A-dependent transferases and synthases. *Plant Physiol* 162:640-651
- Wang SY, Jiao H (2001) Changes in oxygen-scavenging systems and membrane lipid peroxidation during maturation and ripening in blackberry. *J Agric Food Chem* 49:1612-1619

- Wareing PF (1949) Photoperiodic control of leaf growth and cambial activity in *Pinus sylvestris*. *Nature* 163:770
- Wasson RG (1962) A new Mexican psychotropic drug from the mint family. *Botanical Museum Leaflets, Harvard University* 20:77-84
- Waterhouse AL (2002) Determination of total phenolics, *Handbook of food analytical chemistry*, Unit I 1.1: Polyphenolics: p. 464-465, Wiley, New York
- Waugh DS (2011) An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. *Protein Express Purif* 80:283-293
- Wehr L (2002) Untersuchungen zu Proteinaggregationsprozessen mittels dynamischer und elektrophoretischer Lichtstreuung. *Digitale Dissertation*, FU Berlin
- Weitzel C (2009) Rosmarinsäure Biosynthese in Suspensionskulturen von *Melissa officinalis* L. *Dissertation*, Philipps-Universität Marburg
- Weitzel C, Petersen M (2010) Enzymes of phenylpropanoid metabolism in the important medicinal plant *Melissa officinalis* L. *Planta* 232:731-742
- Weitzel C, Petersen M (2011) Cloning and characterisation of rosmarinic acid synthase from *Melissa officinalis* L. *Phytochemistry* 72:572-578
- Wells WW, Xu DP (1994) Dehydroascorbate reduction. *J Bioenerg Biomembr* 26:369-377
- Wichtl M (2002) Teedrogen und Phytopharmaka. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart*
- Wilkinson S, Davies WJ (2009) Ozone suppresses soil drying- and abscisic acid (ABA)-induced stomatal closure via an ethylene-dependent mechanism. *Plant Cell Environ* 32:949-959
- Wilkinson S, Mills G, Illidge R, Davies WJ (2012) How is ozone pollution reducing our food supply? *J Exp Bot* 63:527-536
- Williamson G, Day AJ, Plumb GW, Couteau D (2000) Human metabolic pathways of dietary flavonoids and hydroxycinnamates. *Biochem Soc Trans* 28:16-22
- Wohlgemuth H, Mittelstrass K, Kschieschan S, Bender J, Weigel HJ, Overmyer K, Kangasjarvi J, Sandermann H, Langebartels C (2002) Activation of an oxidative burst in a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. *Plant Cell Environ* 25: 717-726
- Wolters S, Neeb M, Berim A, Schulze Wischeler J, Petersen M, Heine A (2013) Structural analysis of coniferyl alcohol 9-O-methyltransferase from *Linum nodiflorum* reveals a novel active-site environment. *Acta Crystallogr D* 69:888-900
- Wu CH, Murthy HN, Hahn EJ, Paek KY (2007) Enhanced production of caffeic acid, chlorogenic acid and cichoric acid in suspension culture of *Echinacea purpurea* by the manipulation of incubation temperature and photoperiod. *Biochem Eng J* 36:301-303
- Yabuta G, Koizumi Y, Namiki K, Hida M, Namiki M (2001) Structure of green pigment formed by the reaction of caffeic acid esters (or chlorogenic acid) with a primary amino compound. *Biosci Biotechnol Biochem* 65:2121-2130
- Yamamoto HY (1979) Biochemistry of the violaxanthin cycle. *Pure Appl Chem* 51:639-648
- Yamamoto HY, Bassi R (1996) Carotenoids: localization and function. In: Ort, D.R., Yocum, C.F. (Eds.), *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*. *Advances in Photosynthesis*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 539–563
- Yoshida S, Tamaoki M, Shikano T, Nakajima N, Ogawa D, Ioki M, Aono M, Kubo A, Kamada, H, Inoue Y, Saji H (2006) Cytosolic dehydroascorbate reductase is important for ozone tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 47:304–308
- Zenk MH, El-Shagi H, Ulbrich B (1977) Production of rosmarinic acid by cell-suspension cultures of *Coleus blumei*. *Naturwissenschaften* 64:585-586
- Zhang JX, Kirkham MB (1996) Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. *New Phytol* 132:361-373
- Zhao M, Wang H, Yang B, Tao H (2010). Identification of cyclodextrin inclusion complex of chlorogenic acid and its antimicrobial activity. *Food Chem* 120:1138-1142
- Zheng Y, Lyon T, Ollerenshaw JH, Barnes JD (2000) Ascorbate in the leaf apoplast is a factor mediating ozone resistance in *Plantago major*. *Plant Physiol Biochem* 38:403-411

Referenzen

Zhou M, Diwu Z, Panchuk-Voloshina N, Haugland RP (1997) A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: application in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal Biochem* 253:162-168

Internetquellen:

1. "Botanik für Pharmazeuten." von Priv.-Doz. Dr. Thomas Schöpke, Institut für Pharmazie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald [Stand 05.08.2013, 12:30]. URL: http://www.medizinalpflanzen.de/systematik/6_droge/glecom-h.htm
2. "Botanik für Pharmazeuten." von Priv.-Doz. Dr. Thomas Schöpke, Institut für Pharmazie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald [Stand 06.08.2013, 9:30]. URL: http://www.medizinalpflanzen.de/systematik/6_droge/melis-fo.htm
3. "Twenty questions and answers about the ozone layer." DW Fahey [Stand 10.08.2013, 15:10]. URL: http://ozone.unep.org/Assessment_Panels/SAP/Scientific_Assessment_2010/SAP-2010-FAQs-update.pdf
4. European Commission>Environment>Air>Air Quality: Directive 2008/50/EC (adopted 21/05/2008) [Stand 06.11.2013, 11:20]. URL: <http://ec.europa.eu/environment/air/quality/legislation/directive.htm>
5. Umweltbundesamt>Themen>Luft>Regelungen und Strategien>Luftreinhaltung in der EU [Stand 06.11.2013, 11:40]. URL: <http://www.umweltbundesamt.de/luft/reinhaltestrategien/cafe.htm>
6. Laborjournal online: Proteinseparation mit Affinitätstags, Teil 2: Die Sonne bringt es an den Tag von Kay Terpe [Stand 26.08.2013, 14:30]. URL: <http://www.laborjournal.de/rubric/methoden/methoden/v49.lasso>
7. Laborjournal online: Proteinseparation mit Affinitätstags, Teil : Ein Tag, um Großes zu vollbringen von Kay Terpe [Stand 26.08.2013, 15:10]. URL: <http://www.laborjournal.de/rubric/methoden/methoden/v50.lasso>

7. Anhang

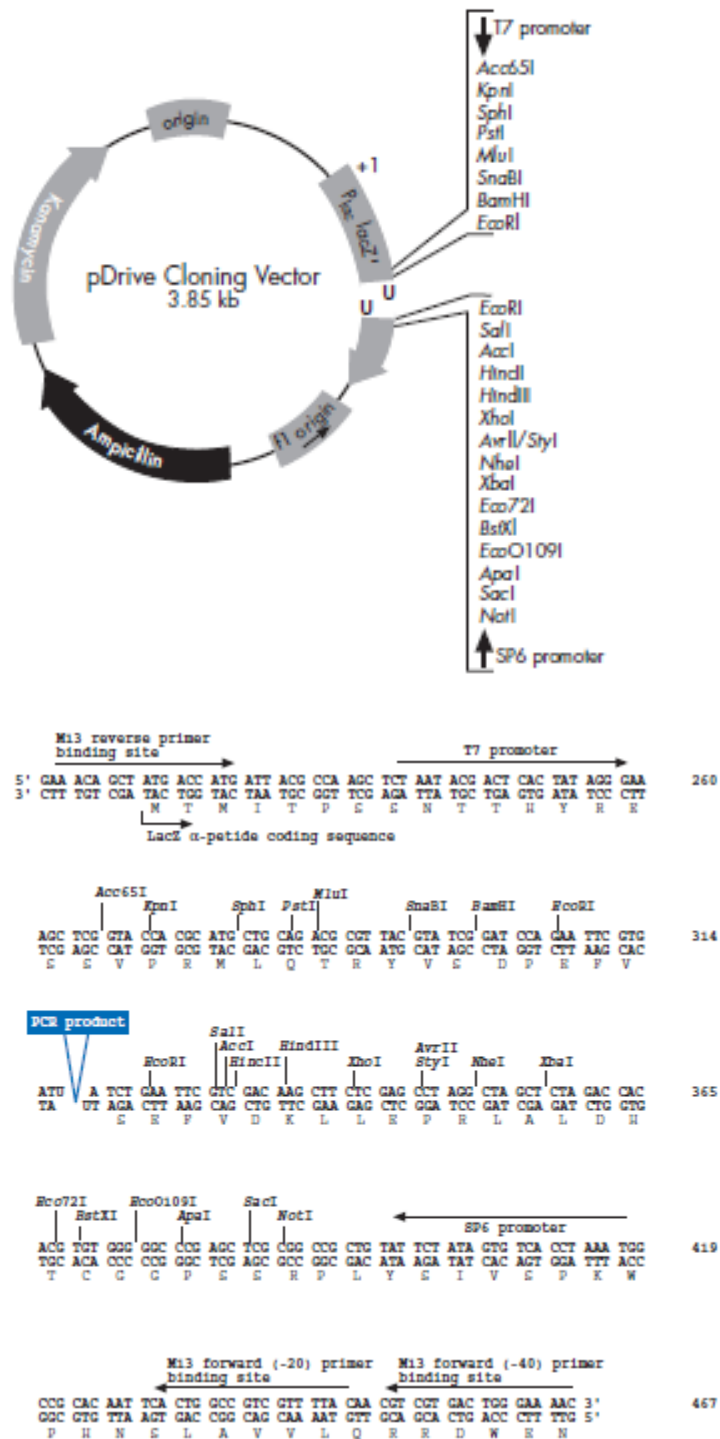
7.1 Abkürzungen von Aminosäuren und Nukleotiden

| Aminosäure | Dreibuchstabencode | Einbuchstabencode |
|----------------|--------------------|-------------------|
| Alanin | Ala | A |
| Arginin | Arg | R |
| Asparagin | Asn | N |
| Asparaginsäure | Asp | D |
| Cystein | Cys | C |
| Glutamin | Gln | Q |
| Glutaminsäure | Glu | E |
| Glycin | Gly | G |
| Histidin | His | H |
| Isoleucin | Ile | I |
| Leucin | Leu | L |
| Lysin | Lys | K |
| Methionin | Met | M |
| Phenylalanin | Phe | F |
| Prolin | Pro | P |
| Serin | Ser | S |
| Threonin | The | T |
| Tryptophan | Trp | W |
| Tyrosin | Tyr | Y |
| Valin | Val | Z |

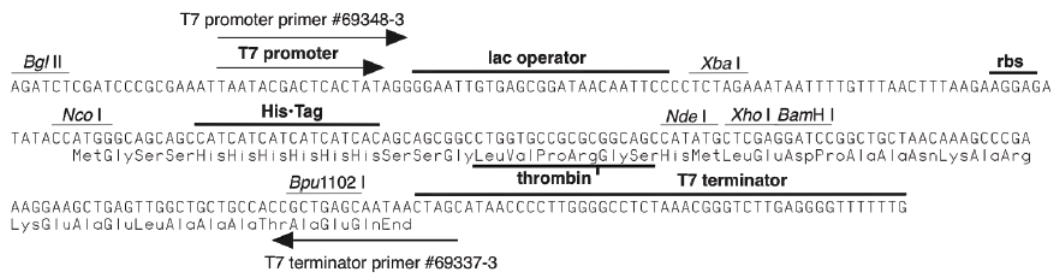
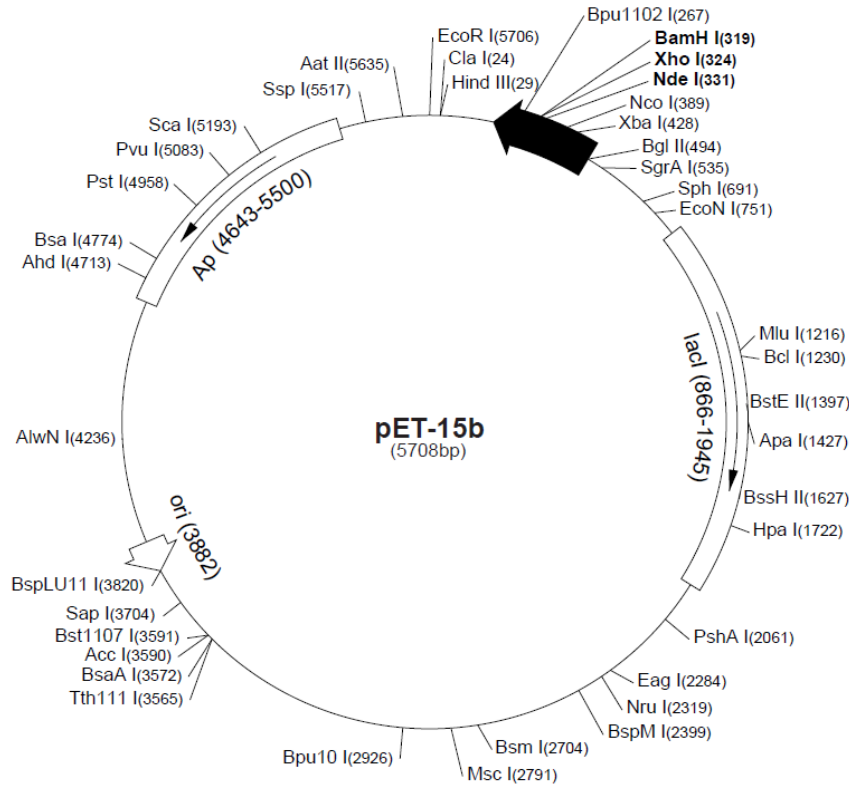
| Base | Abkürzung |
|-------------|------------------|
| Adenin | A |
| Cytosin | C |
| Guanin | G |
| Thymin | T |

7.2 Vektorkarten

7.2.1 pDrive®-Vektor



7.2.2 pET-15b-Vektor



7.3 Medien

7.3.1 LB-Medium

| |
|--|
| LB-Medium |
| 10 g Trypton |
| 5 g Hefe |
| 10 g Natriumchlorid |
| ad 1 l Aqua dest. |
| mit 0,5 M NaOH auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren |

Festmedium: Zusatz von 1% Agar

7.3.2 SOC-Medium

| |
|---|
| SOC-Medium |
| 0,5 g Hefeextrakt |
| 2 g Trypton |
| 50 mg NaCl |
| 2,5 ml 1 M KCl |
| ad 100 ml Aqua dest. |
| Lösung autoklavieren, vor Gebrauch Zugabe von 2 ml einer 1 M Glucoselösung und 1 ml einer Lösung aus 1 M MgCl ₂ und 1 M MgSO ₄ (sterilfiltriert), pH: 6,8-7 |

7.3.3 M9-Minimalmedium

| |
|---|
| M9-Minimalmedium |
| 6 g Na_2HPO_4 |
| 3 g KH_2PO_4 |
| 0,5 g NaCl |
| 1 g NH_4Cl |
| ad 800 ml mit Aqua dest. auffüllen, autoklavieren |
| Zugabe von folgenden sterilen Komponenten: |
| 1 ml 100 mM CaCl_2 |
| 1 ml 1 M MgSO_4 |
| 0,3% Glycerol |
| ad 1 l mit Aqua dest. auffüllen |

7.3.4 CB-Medium

| Zusammensetzung des CB-Mediums | |
|---|---------------|
| Makroelemente | Konzentration |
| KNO_3 | 2500 mg/l |
| $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ | 250 mg/l |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ | 172 mg/l |
| $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ | 150 mg/l |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 134 mg/l |
| $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ | 25,6 mg/l |
| $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ | 34,3 mg/l |
| Mikroelemente | Konzentration |

| | | |
|---|---------------|------|
| H ₃ BO ₃ | 3 | mg/l |
| ZnSO ₄ x 7 H ₂ O | 3 | mg/l |
| MnSO ₄ x 5 H ₂ O | 1 | mg/l |
| KI | 0,75 | mg/l |
| Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O | 0,25 | mg/l |
| CuSO ₄ x 5 H ₂ O | 0,25 | mg/l |
| CoCl ₂ x 6 H ₂ O | 0,25 | mg/l |
| Hormone: | Konzentration | |
| Kinetin | 0,2 | mg/l |
| IES | 0,5 | mg/l |
| 2,4-D | 2 | mg/l |
| NAA | 0,5 | mg/l |
| Vitamine | Konzentration | |
| Thiamindichlorid | 10 | mg/l |
| Pyridoxin/HCl | 1 | mg/l |
| Nicotinsäure | 1 | mg/l |
| weitere Zusätze: | Konzentration | |
| NZ-Amine | 2000 | mg/l |
| myo-Inosit | 100 | mg/l |
| Saccharose | 20/40 | g/l |
| nach Lösen der verschiedenen Bestandteile, auf einen pH 5,5 einstellen und bei 20 min, 121 °C und 1 bar Überdruck autoklavieren | | |

7.4 Geräte und Reagenzien

7.4.1 Geräte

| | | |
|---|--|---|
| Autoklav | Systec VX-150 Advantage–Lab AL02-02-100 Alfa | Systec GmbH Labor-Systemtechnik International Pbi |
| Bakterienschüttler | | Gallenkamp |
| Dialysierschlauch | ZelluTrans Roth® | Roth |
| Elektrophoresekammer | PowerPac™ Basic | Bio-Rad |
| Fluoreszenz/Absorptions-Mikroplattenleser | Victor 3 1420 Multilabel Counter | PerkinElmer |
| Fluorometer | PAM-2000 | Walz |
| Gefriertrockner | Christ L1 | B.Braun Biotech. |
| Geldokumentationssystem | Quick Store „plus“ FIRE READER XS D-55-26-MX | RS-Laborgeräte UVITEC |
| Fast Protein Liquid Chromatography | Äkta FPLC | GE Healthcare Europe GmbH |
| HPLC | L-6000 Pump D-2500 Chromato-Integrator HPLC Pump 680 Spectra System P4000, SN4000 | Merck-Hitachi Merck-Hitachi Thermo Scientific (früher: Dionex) Thermo Scientific |
| Infrarotgasanalysator | CIRAS-2 | PP-Systems |
| Konduktometer | Conmet 1W | HANNA |
| Kristallisationsplatten | VDX-Platten (HR3-140) | Hampton Research |
| Kristallisationsroboter | Cartesian Microsys™ SQ4000 | Genomic solutions |
| Lichtmikroskop | DM 4000 B | Leica |
| Magnetrührer | MR 3001 Arbo Stirrer | Heidolph Instr. Arex |
| Ozongenerator | MacZero® Toxigas 900 | Aeron |

| | | |
|---------------------------------|---|---|
| Ozonanalysator | Model: 8810 | Monitor Labs |
| PCR-Geräte | Eppendorf Mastercycler® gradient Rotor-Gene Q SN R 02 10123 | Eppendorf Qiagen |
| pH-Elektroden | Accumed Basic | Fisher Scientific |
| | pH 211 Microprocessor pH Meter | HANNA Instruments |
| Photometer | BioPhotometer UVIKON Spectrophotometer 930 6505 UV/Vis | Eppendorf Kontron Instruments Jenway |
| Refraktometer | HR-18 | A. Krüss Optronic GmbH |
| Rundschüttler | BB-306 | INFORS AG |
| Säulen | Acclaim 120 Equisil ODS GPC Säule HiLoad™ 26/60 Superdex 200 GPC Säule HiLoad™ 26/60 Superdex 75 | Thermo Scientific (frü- her: Dionex) Dr. Maisch HPLC GmbH GE Healthcare Europe GmbH GE Healthcare Europe GmbH |
| Schüttler für Bakterienkulturen | - | Gallenkamp |
| Schlagmesserhomogenisator | Ultra Turrax T25 Basic | IKA |
| Spannungsgeber | E835 | Consort |
| Spektrophotometer | 6505 UV/Vis | Jenway |
| Sterilbank | BluMini PCR Class II Laminar Flow Cabinet Gelaire Laminar Air Flow Class 100 | BLUAIR Gelman Instrument |
| Thermomixer | Comfort | Eppendorf |
| Trockenofen | GFD | Binder |
| Ultraschallbad | Sonorex Super RK 510 H | Bandelin |
| Ultraschallprozessor | UP 200S | Dr. Hielscher |
| UV-Handlampe | HL-6-KM | Bachofer GmbH |
| Vortex | Vortex-Genie 2 Vortex Mixer | Scientific Industries VELP Scientifica |

| | | |
|---------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Waagen | PT 310 | Sartorius |
| | Analysenwaage EG 300-3M | Kern |
| | Analysenwaage H64 | Mettler |
| | Pioneer™ PA214C | Ohaus |
| | Precisa X B620C | Precisa Gravimetrics |
| Wachstumschammer | Eigenkonstruktion | Bertagnin |
| Wasserbad | Bagnomaria DAS 18020 | InterContinental |
| Weißlichtlampen | SON-T 400W/220 E40 1SL | Philips |
| | MASTER HPI-T Plus 400W/645 E40 | Philips |
| Zentrifugen | Biofuge 17RS | Heraeus Sepatech |
| | Rotina 380 R | Hettich |
| | Centrifuge 5415D | Eppendorf |
| | Centrifuge 5415 R | Eppendorf |
| | Sigma 3K30 | B.Braun Biotech. International |
| | Sorvall RC6+ | Thermo Scientific |
| Zentrifugalkonzentratoren | Vivaspin 20 VS2001 | Sartorius |

7.4.2 Reagenzien

| | |
|--|----------------------------------|
| 30% Acrylamidstammlösung + 2% Bisacrylamid | Roth |
| 6xLoading Dye | Fermentas (jetzt: Thermo Fisher) |
| Agarose | Roth |
| Ammoniumperoxydisulfat | Sigma-Aldrich |
| Ampicillin | Roth |
| Bathophenanthrolin | Sigma-Aldrich |
| Borsäure | Roth |
| BSA | Roth, Sigma-Aldrich |
| CAPS | Roth |
| Chloralhydrat | Sigma-Aldrich |
| Chlorogensäure | Fluka (jetzt Sigma-Aldrich) |
| Coenzym A-Trilithiumsalz-Dihydrat | AppliChem GmbH |
| Coomassie [®] Brilliant Blue G250 | Fluka (jetzt Sigma-Aldrich) |
| CTAB | Roth |
| DAB | Sigma-Aldrich |
| DL-p-Hydroxyphenyllactat | Sigma-Aldrich |
| dNTPs | Fermentas (jetzt: Thermo Fisher) |
| DPPH | Sigma-Aldrich |
| DTT | Serva, Sigma-Aldrich |
| Dye Reagent Concentrate | Bio-Rad |
| EDTA | Roth |
| Eisessig | Carlo Erba Reagents |
| Ethanol | Sigma-Aldrich |
| Ethidiumbromid 1% | AppliChem GmbH |
| Evans Blue | Carlo Erba Reagents |
| FeCl ₃ | Sigma-Aldrich |
| Folin-Ciocalteu | Titolchimica |
| GeneRuler [™] DNA Ladder Mix | Thermo Scientific |
| Glycerin | Roth |
| Guanidinthiocyanat | Roth |
| H ₂ O ₂ | Panreac Quimica S.L.U. |
| Imidazol | Roth |
| IPTG | Roth |
| Izit Crystal Dye | Hampton Research |
| K ₂ HPO ₄ | Carlo Erba Reagents, Roth |
| KH ₂ PO ₄ | Carlo Erba Reagents, Roth |
| Lithiumchlorid | Roth |
| Natriumacetat | Roth |
| Natriumcitrat | Roth |
| N-Ethylmaleimid | Santa Cruz Biotechnology |
| Ninhydrin | Sigma-Aldrich |
| N-Lauroylsarcosin | Sigma-Aldrich |
| Phosphorsäure | Riedel-de Haën |

| | |
|--|----------------------------------|
| PVP 1 % | Sigma-Aldrich |
| PVP 10 | Sigma-Aldrich |
| Restriktionsendonukleasen | Fermentas (jetzt: Thermo Fisher) |
| RNAse H | Fermentas (jetzt: Thermo Fisher) |
| Rosmarinsäure | Laborfundus |
| Roti Load | Roth |
| Roti [®] -Mark Plus | Roth |
| Roti [®] -Mark Standard | Roth |
| Shikimisäure | Roth |
| Silikonfett (niedrigviskos) | Bayer |
| Succinimidester | Laborfundus |
| Sulfosalicylsäure | Sigma-Aldrich |
| TBA | Sigma-Aldrich |
| TCA | Roth, Sigma-Aldrich |
| Tdt (Terminale Desoxynukleotidyltransferase) | Fermentas (jetzt: Thermo Fisher) |
| Tetramethyldiamin | Roth |
| Tris-HCl | Roth |
| Triton X-100 | Roth |
| X-Gal | Roth |
| XTT | Sigma-Aldrich |

7.4.3 Molekularbiologische Reagenzien/Kits

| | |
|--|----------------|
| 2x iQ™ SYBR® Green Supermix | Bio-Rad |
| Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Kit | Invitrogen |
| Clean Cleavage™-Kit | Sigma-Aldrich |
| Gene Ruler™ DNA Ladder Mix | Thermo Fischer |
| GoTaq® Flexi DNA Polymerase Kit | Promega |
| NucleoSpin®-Extract II Kit | Macherey-Nagel |
| PCR-Klonierungskit | Qiagen |
| Protein Refolding Kit | Novagen |
| QIAprep® Spin Miniprep Kit | Qiagen |
| Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit | Thermo Fischer |
| SoluBL21™ Competent <i>E. coli</i> | Amsbio |
| SYBR® Green I Farbstoff | Invitrogen |

7.4.4 Kristallisationsscreens

Die Zusammensetzung der Lösungen der Kristallisationsscreens Hampton Crystal Screen, Wizard I und II und Cryo I und II wurden aus den Unterlagen von Hampton Research/Sigma Aldrich entnommen und von Herrn Christian Sohn aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Gerhard Klebe hergestellt.

7.5 HPLC-Chromatogramme

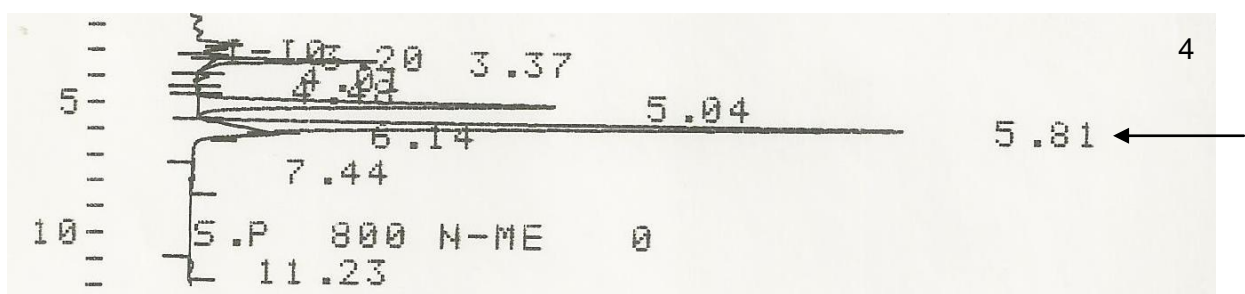
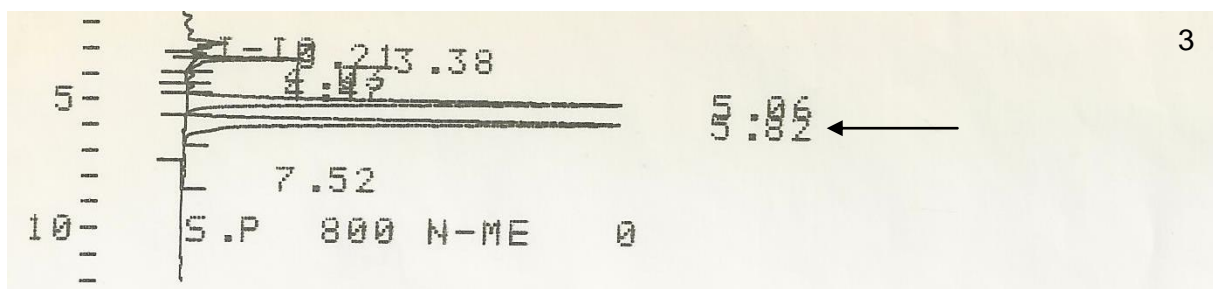
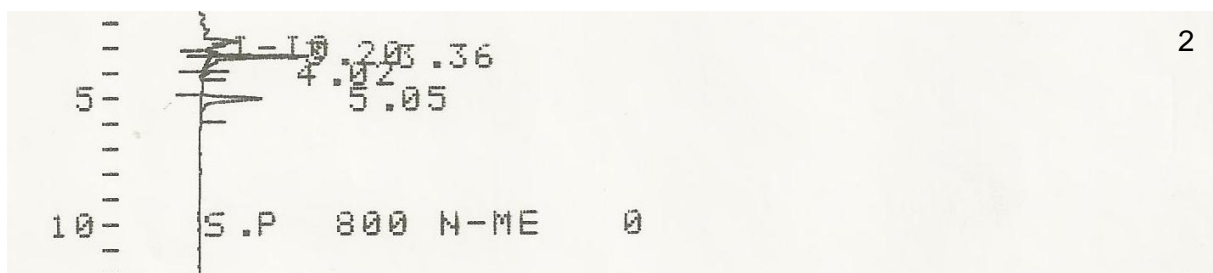
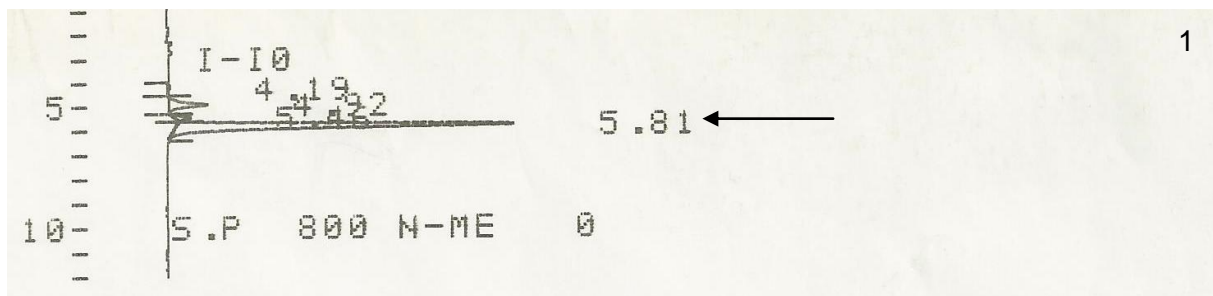


Abbildung 130: HPLC-Chromatogramme der RAS-Enzymtests nach Expression in *E. coli* BL21 (DE3)pLysS: 1: Standard: 0,5 nmol Caf-pHPL, 2: Nullprobe (Enzymtest ohne Enzym), 3: Inkubationszeit: 5 min, 4: Inkubationszeit: 15 min. Die Produkt- und Standardpeaks sind mit einem Pfeil markiert.

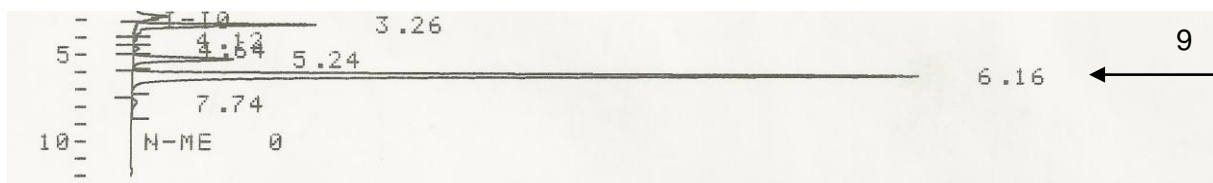
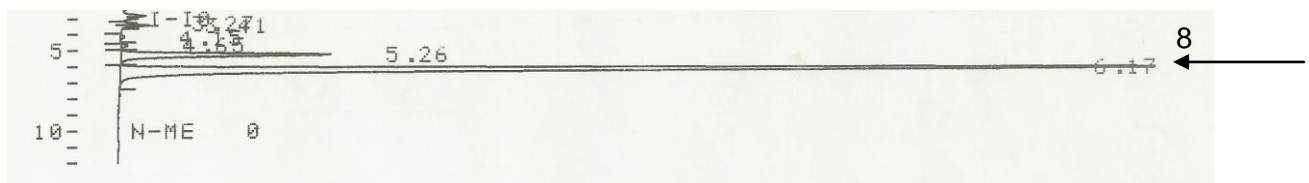
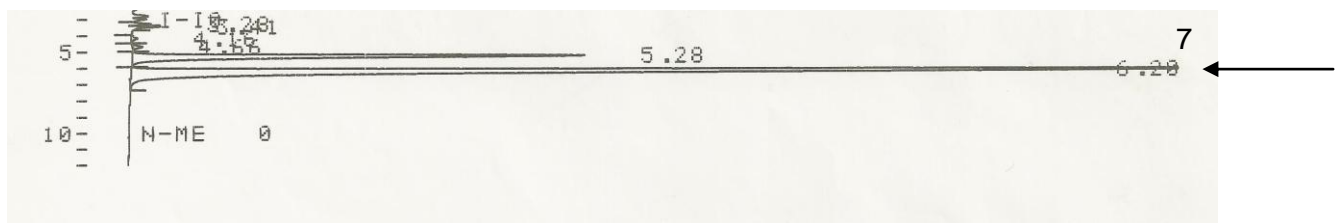
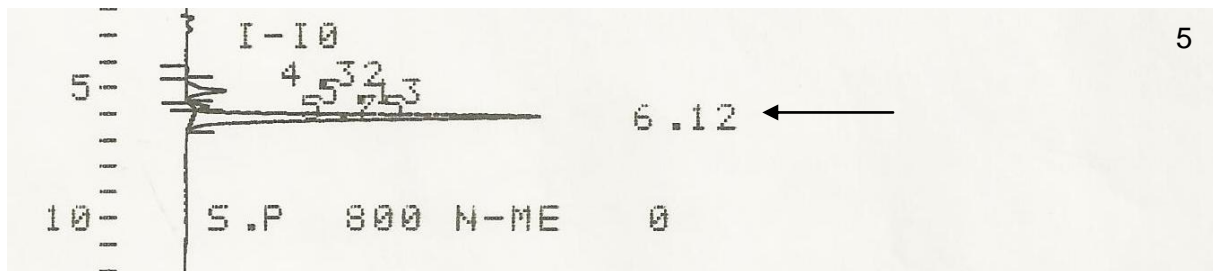
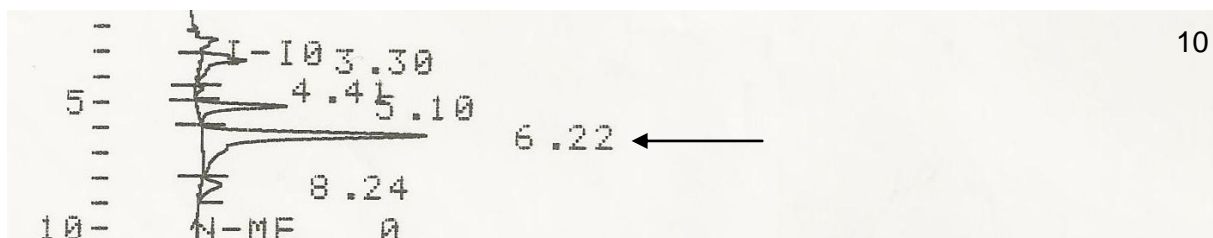


Abbildung 131: HPLC-Chromatogramme der RAS-Enzymtests nach Resolubisierung und Rückfaltung mit dem „Protein Refolding and Solubilization Kit“ der Firma Novagen. 5: Standard: 0,5 nmol Caf-pHPL, 6: Nullprobe, 7: Inkubationszeit: 5 min, 8: Inkubationszeit: 15 min, 9: Inkubationszeit: 30 min. Die Produkt- und Standardpeaks sind mit einem Pfeil markiert.



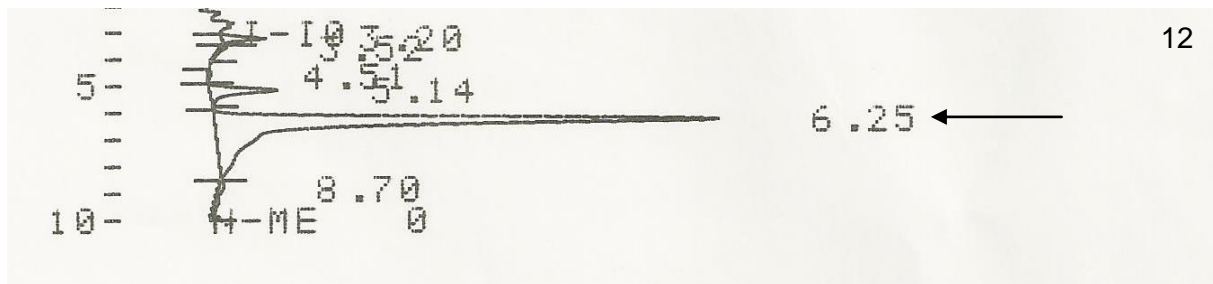
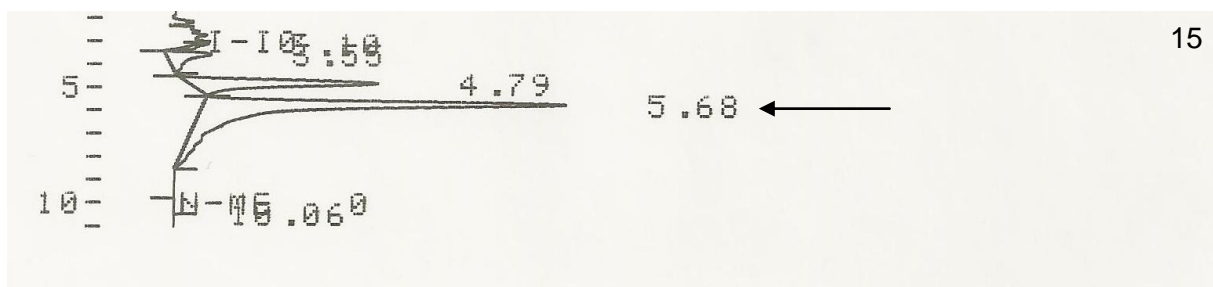
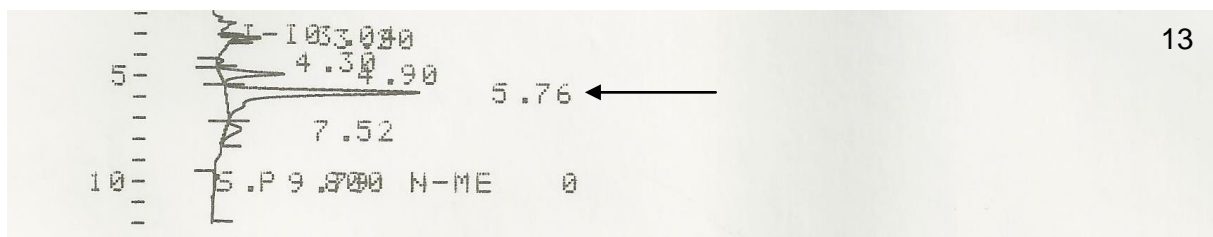
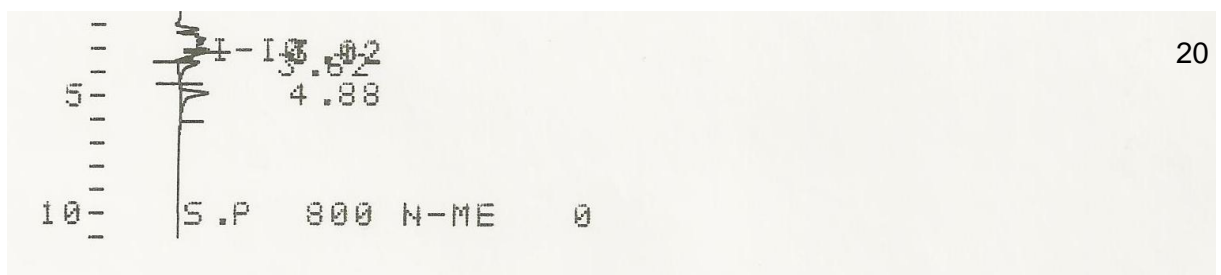
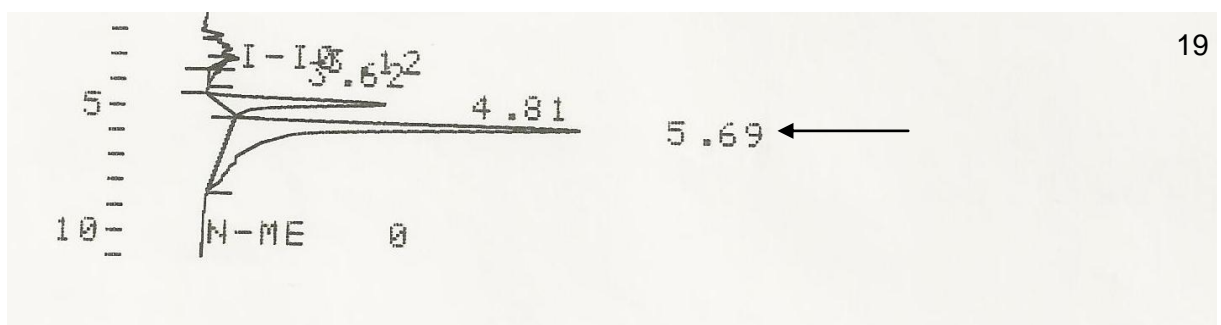
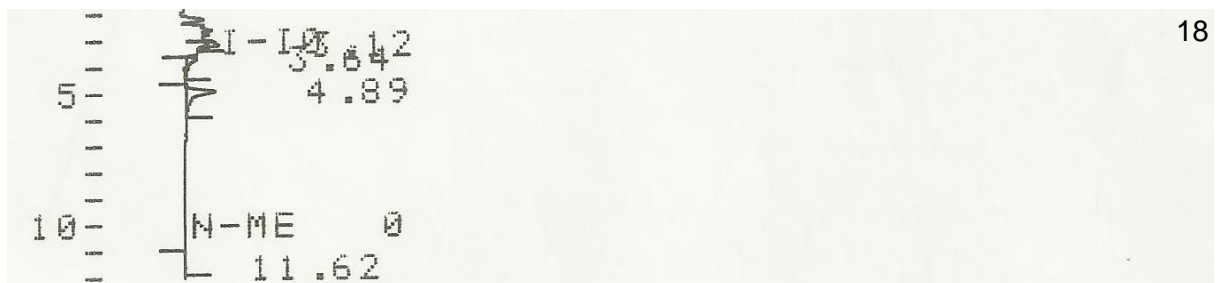
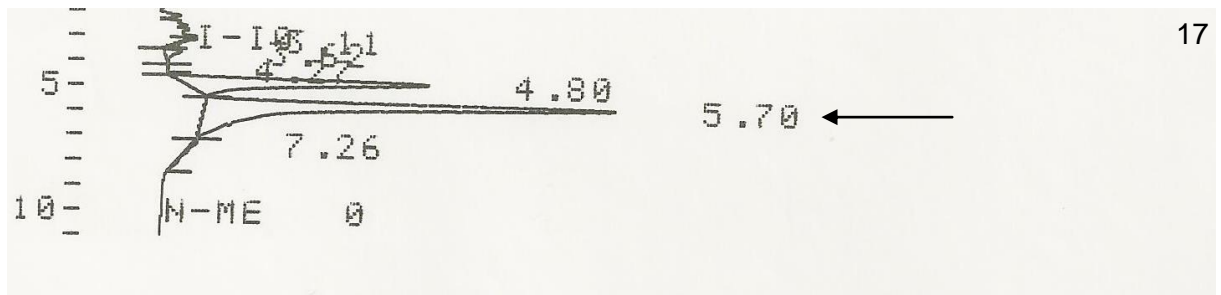
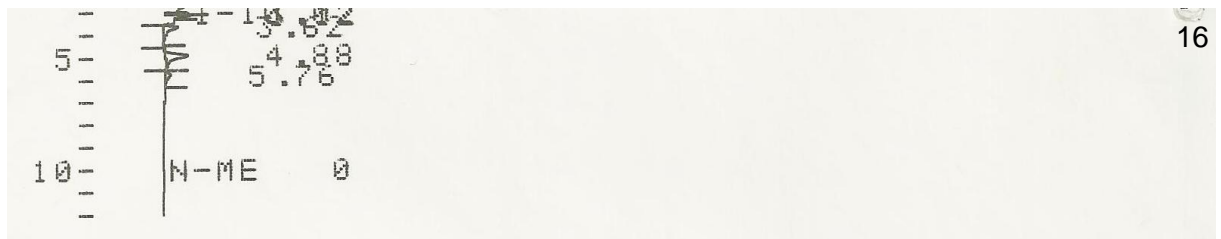


Abbildung 132: HPLC-Chromatogramme der RAS-Enzymtests (Inkubationszeit: 15 min) nach Resolubisierung und Rückfaltung mit dem „Protein Refolding and Solubilization Kit“ der Firma Novagen und Aufreinigung über His-tag-Affinitätschromatographie: 10: Standard: 0,5 nmol Caf-pHPL, 11: Elutionsfraktion 1, 12: Elutionsfraktion 2. Die Produkt- und Standardpeaks sind mit einem Pfeil markiert.





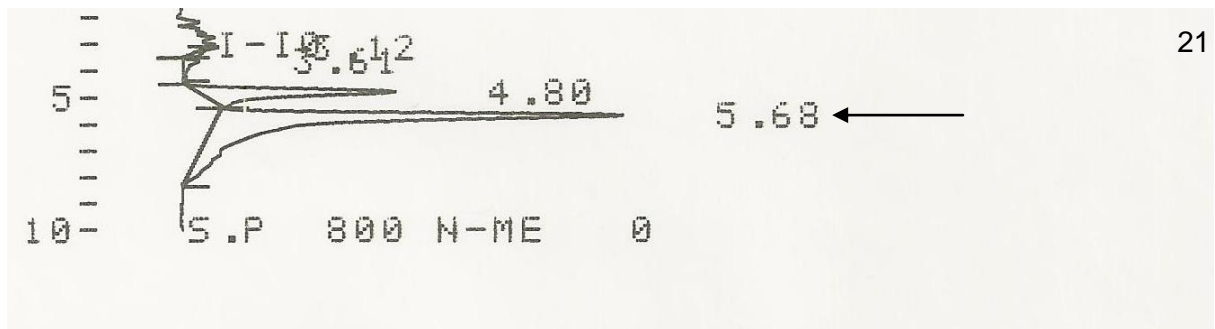
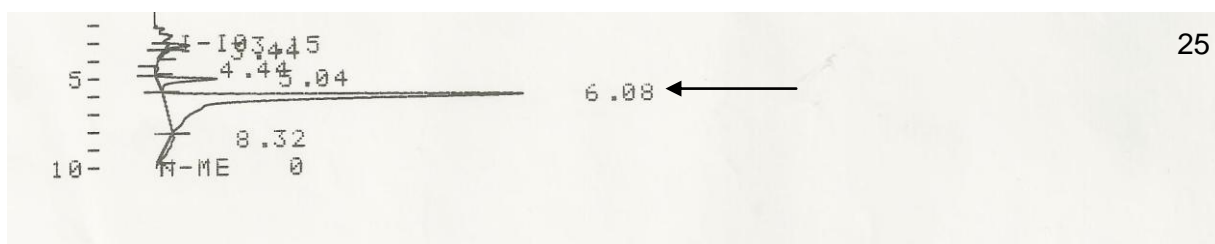
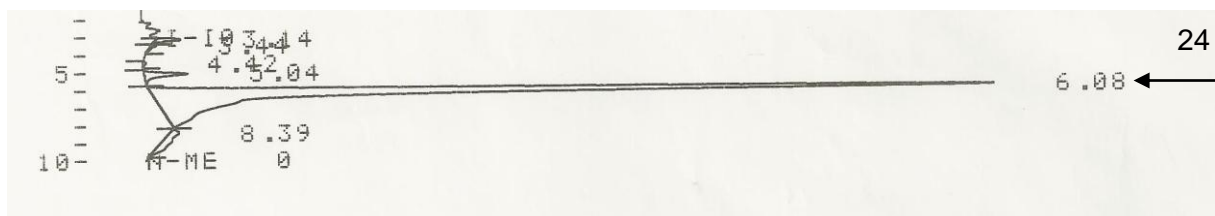
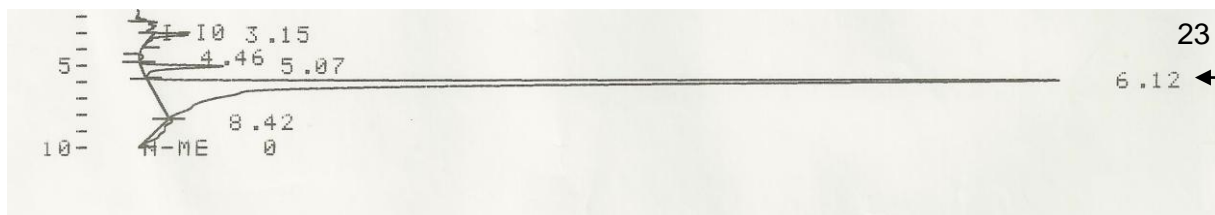
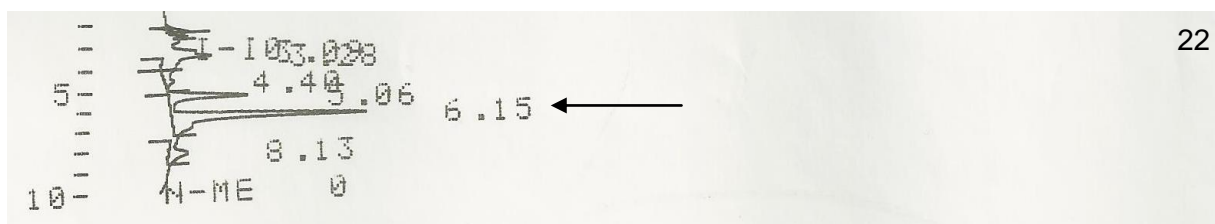


Abbildung 133: HPLC-Chromatogramme der RAS-Enzymtests (Inkubationszeit: 5 min) von vier verschiedenen Rohextrakten nach Resolubisierung und Rückfaltung mit dem „Protein Refolding and Solubilization Kit“ der Firma Novagen: 13: Standard: 0,5 nmol Caf-pHPL, 14: Nullprobe 1, 15: Rohextrakt 1, 16: Nullprobe 2, 17: Rohextrakt 2, 18: Nullprobe 3, 19: Rohextrakt 3, 20: Nullprobe 4, 21: Rohextrakt 4. Die Produkt- und Standardpeaks sind mit einem Pfeil markiert.



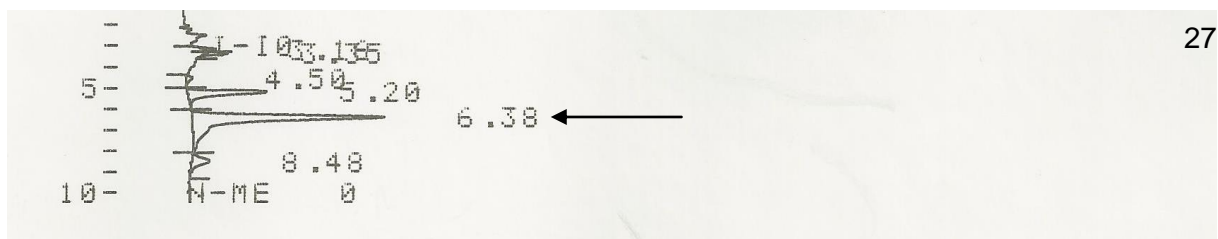
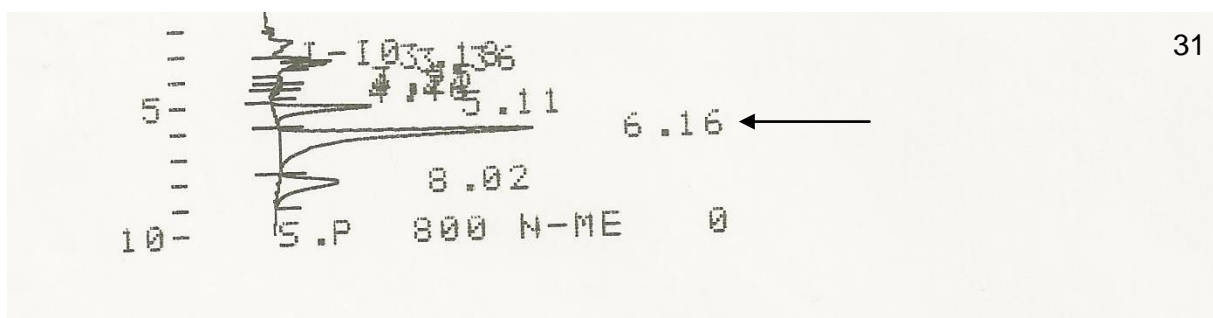
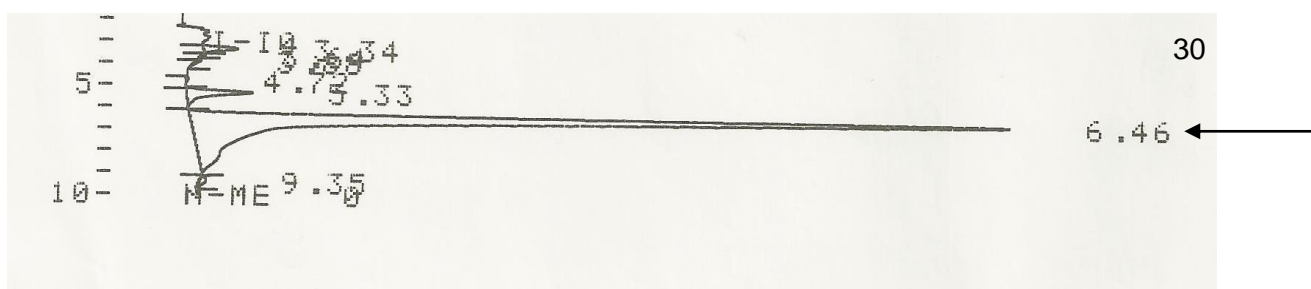
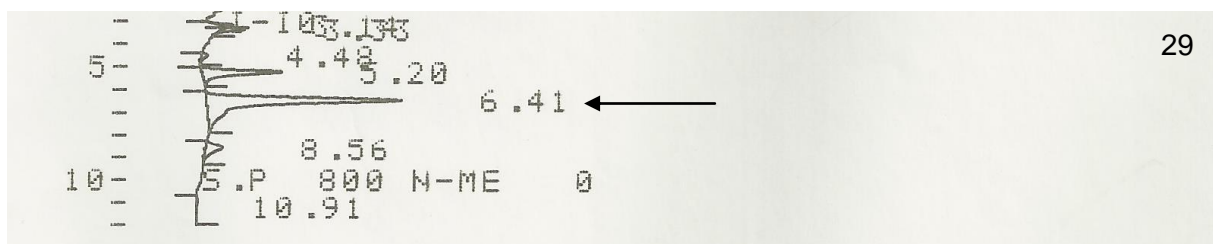


Abbildung 134: HPLC-Chromatogramme der RAS-Enzymtests (Inkubationszeit: 5 min) nach erneuter Solubilisierung von Rohextrakt 1 des CbRAS-Proteins aus inclusion bodies: 22: Standard: 0,5 nmol Caf-pHPL, 23: Rohextrakt 1 nach einmonatiger Lagerung bei 4 °C, 24: zweite Solubilisierung mittels 1x IB Solubilization Buffer, 25: zweite Solubilisierung mittels 10x IB Solubilization Buffer, 26: zweite Solubilisierung mittels 10x IB Solubilization Buffer + 4,5 M Harnstoff, 27: Standard: 0,5 nM Caf-pHPL, 28: zweite Solubilisierung mit 100 mM KH_2PO_4 + 100 mM L-Arginin. Die Produkt- und Standardpeaks sind mit einem Pfeil markiert.



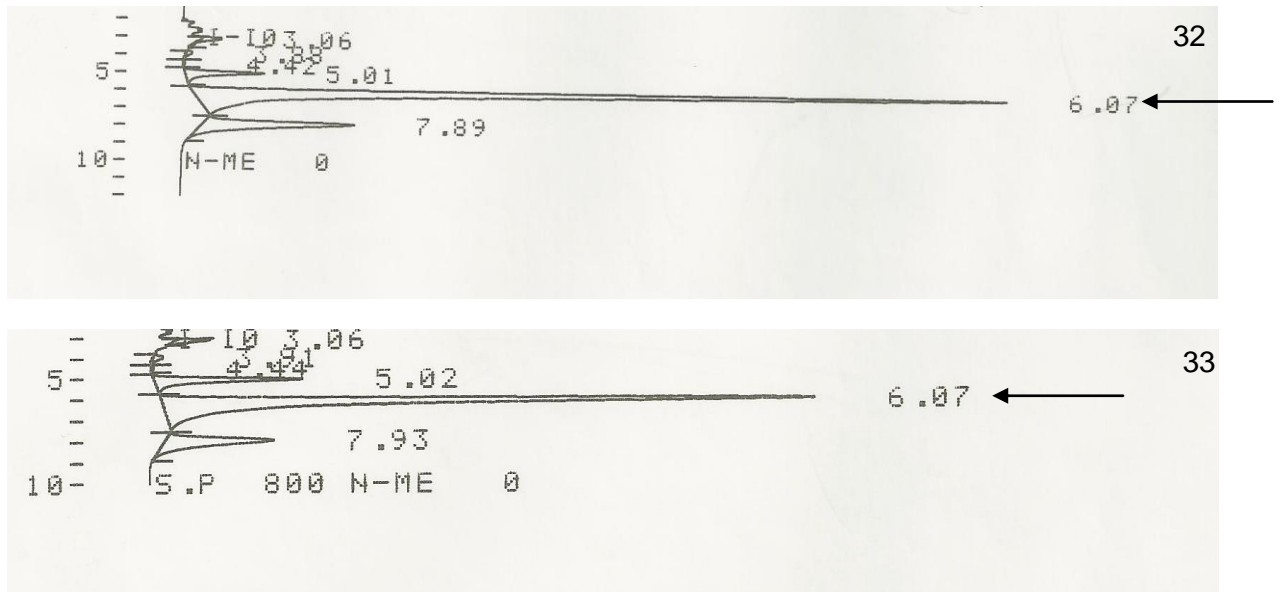
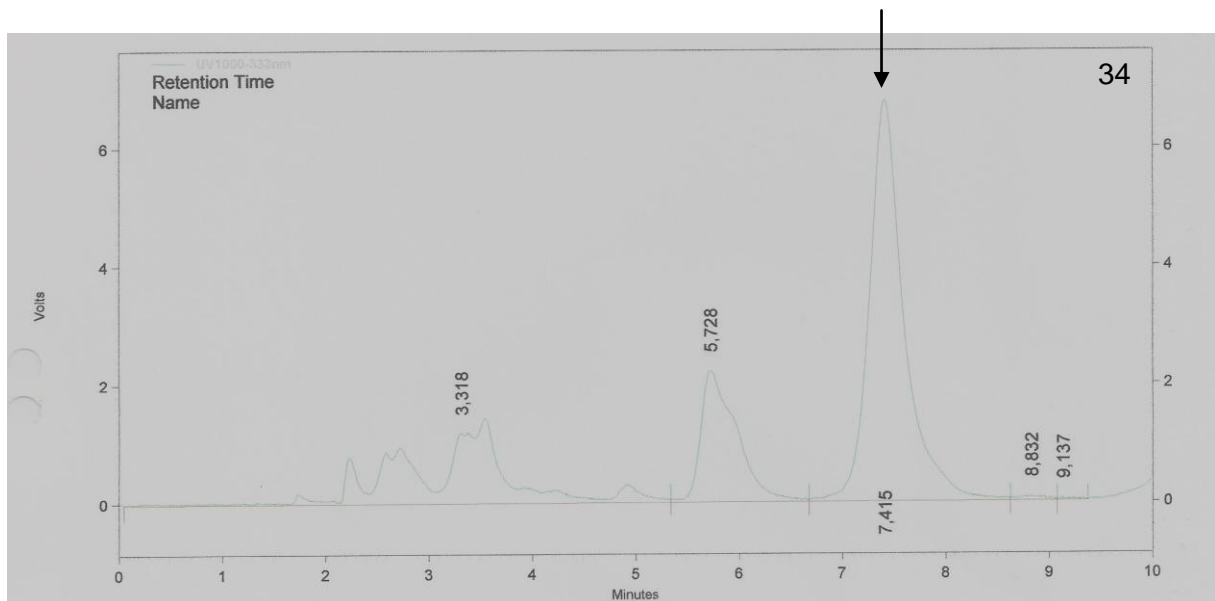


Abbildung 135: HPLC-Chromatogramme der RAS-Enzymtests (Inkubationszeit: 5 min) der Elutionsfraktion des Rohextrakts 1 des CbRAS-Proteins aus inclusion bodies nach der zweiten Solubilisierung mit 1x IB Solubilization Buffer: 29: Standard: 0,5 nmol Caf-pHPL, 30: Elutionsfraktion; 31: Standard: 0,5 nmol Caf-pHPL, 32: zweite Solubilisierung der Elutionsfraktion, 33: dritte Solubilisierung der Elutionsfraktion. Die Produkt- und Standardpeaks sind mit einem Pfeil markiert.



Anhang

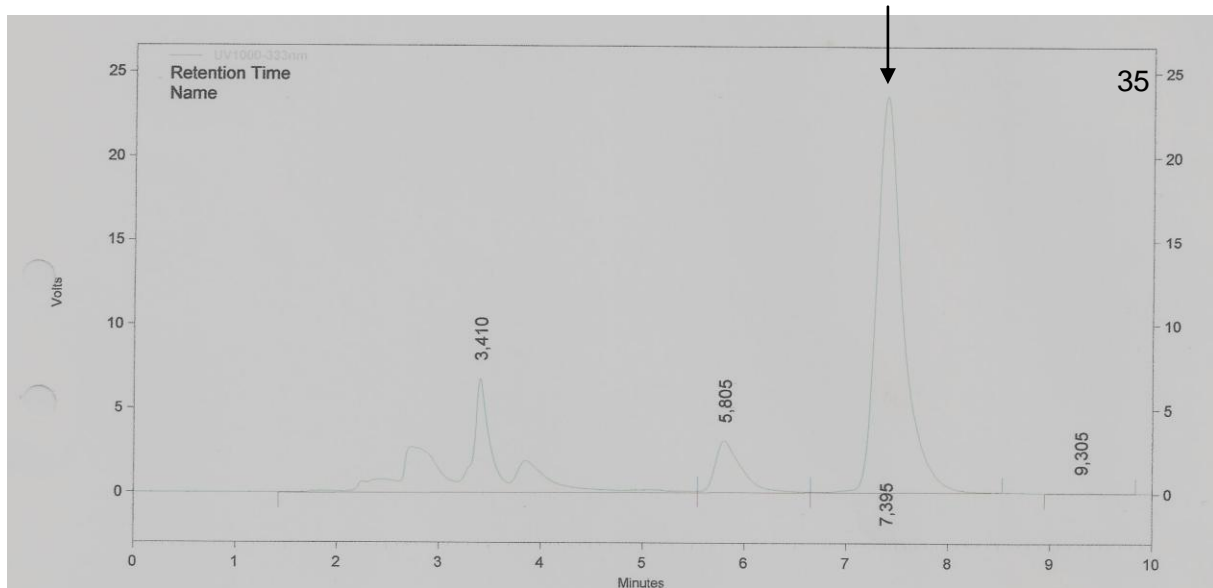
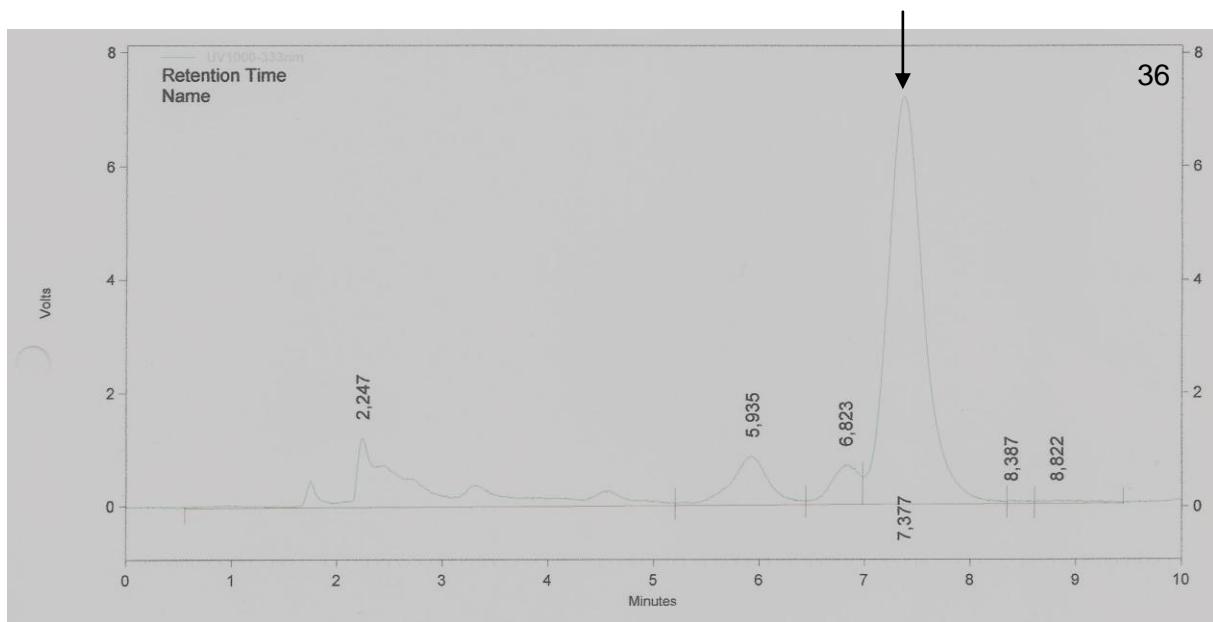


Abbildung 136: HPLC-Chromatogramme der RAS-Enzymtests (Inkubationszeit: 5 min) nach CbRAS-Expression durch SoluBL21™ aus 100 ml Bakteriensuspension und His-tag-Aufreinigung: 34: Standard: 0,5 nmol Caf-pHPL, 35: Elutionsfraktion. Die Produkt- und Standardpeaks sind mit einem Pfeil markiert.



Anhang

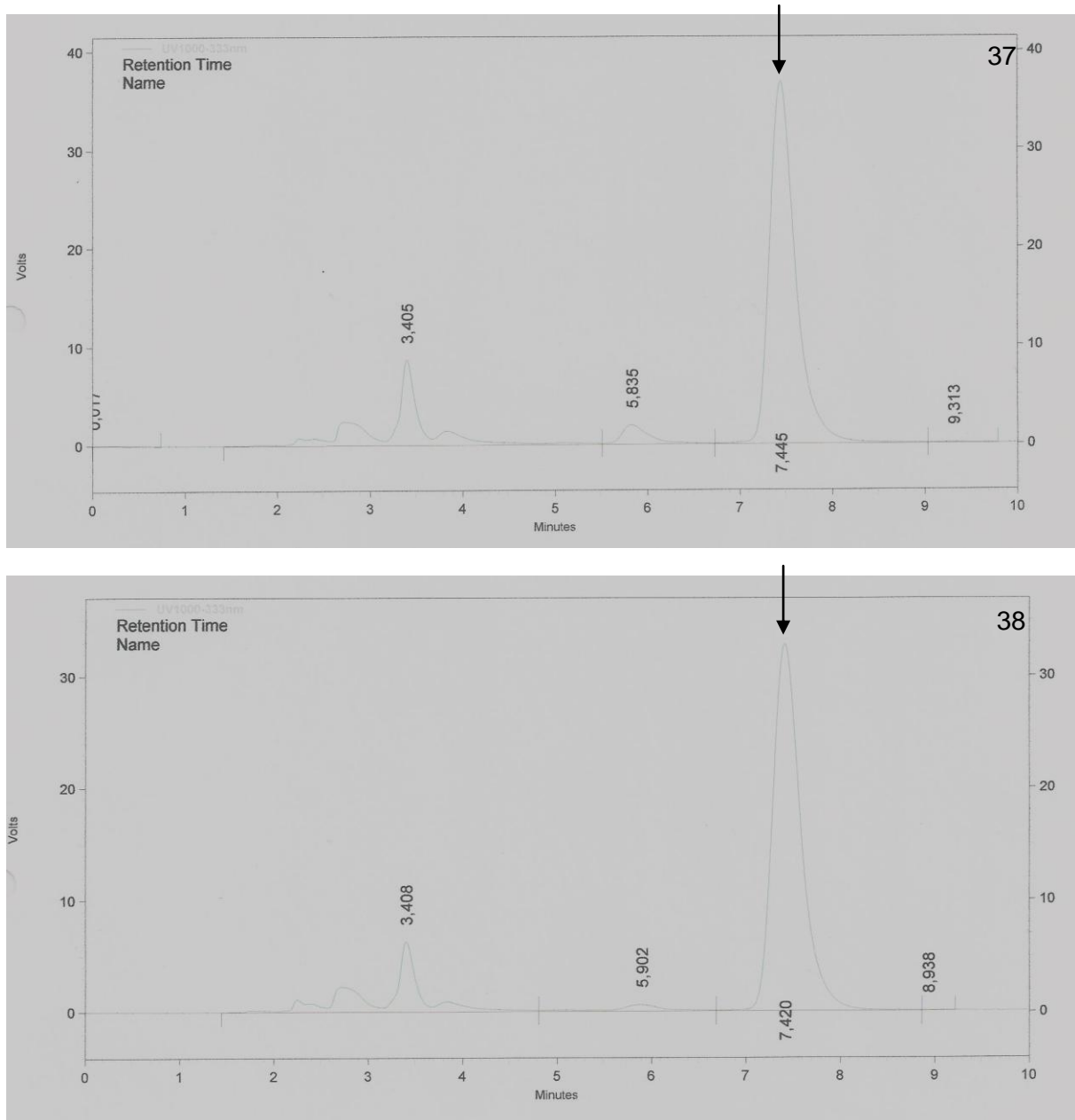
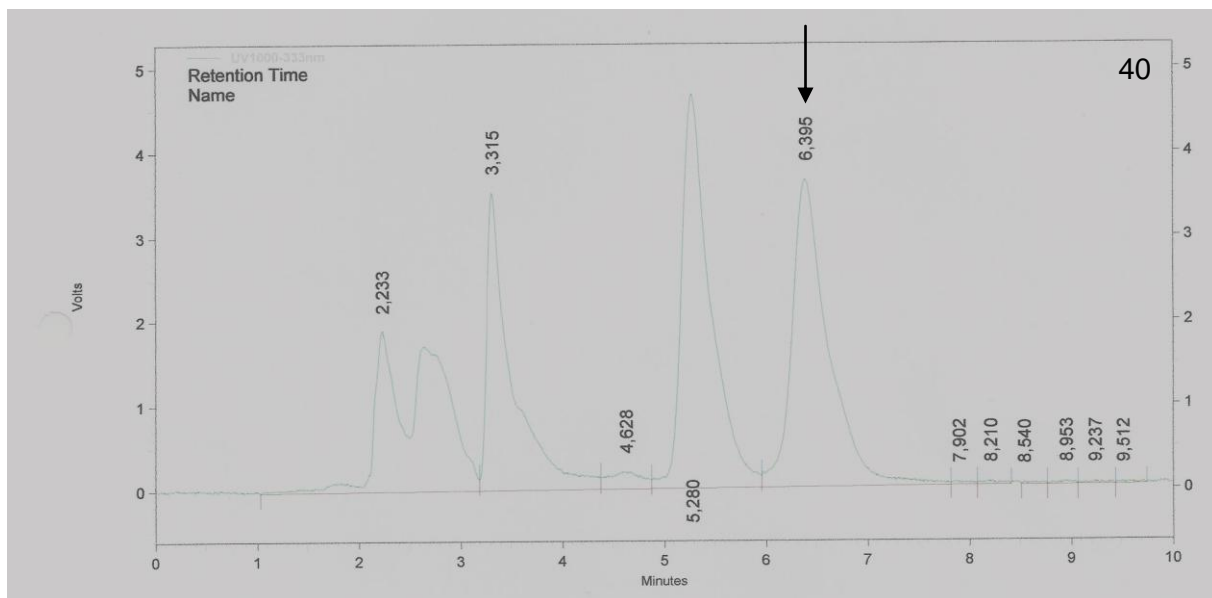
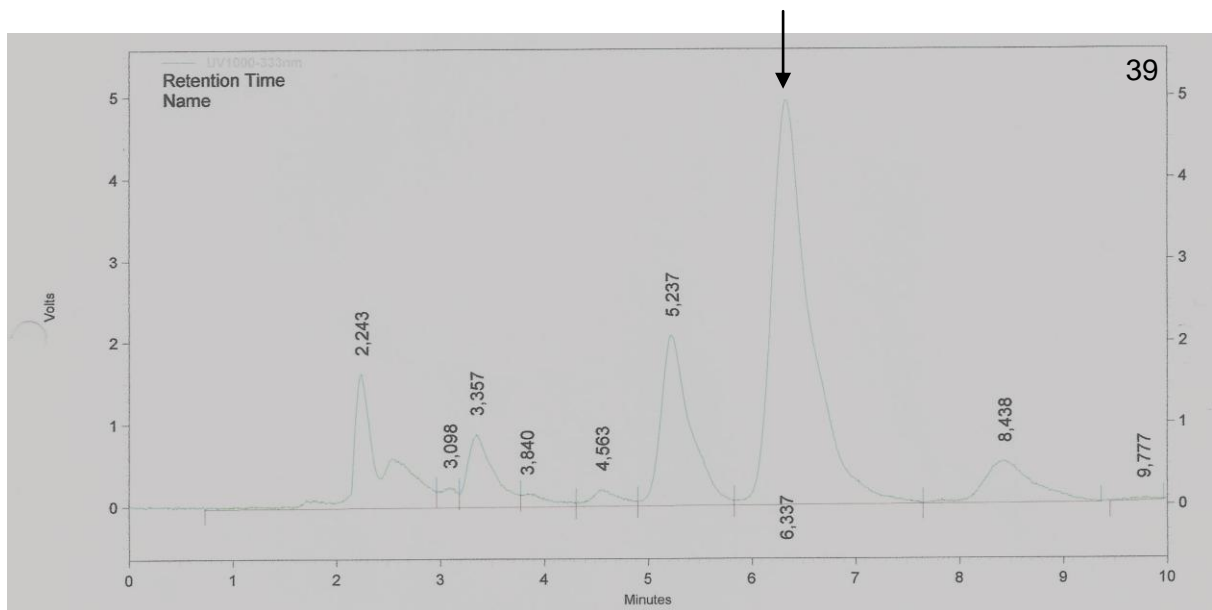


Abbildung 137: HPLC-Chromatogramme der RAS-Enzymtests nach CbRAS-Expression durch SoluBL21™ aus 100 ml Bakteriensuspension und His-tag-Aufreinigung. Bestimmung des Aktivitätsmaximums der CbRAS-Elutionsfraktion durch verschiedene Konzentrationen: 36: Standard: 0,5 nmol Caf-pHPL, 37: Elutionsfraktion 1:50 verdünnt (5 min Inkubationszeit), 38: Elutionsfraktion 1:10 verdünnt (5 min Inkubationszeit). Die Produkt- und Standardpeaks sind mit einem Pfeil markiert.

Anhang



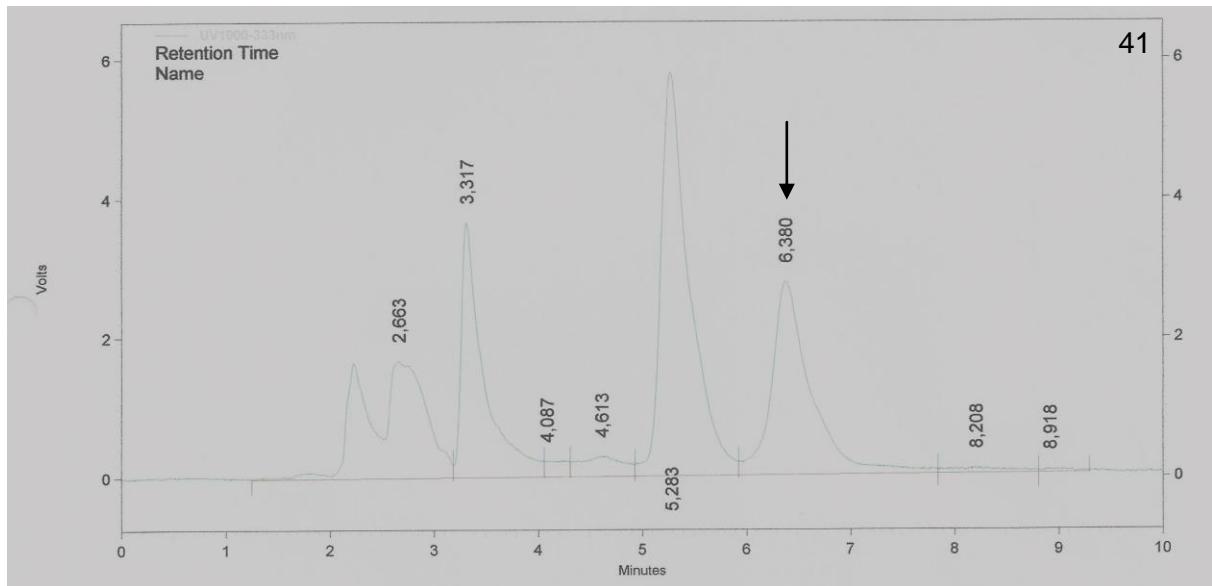
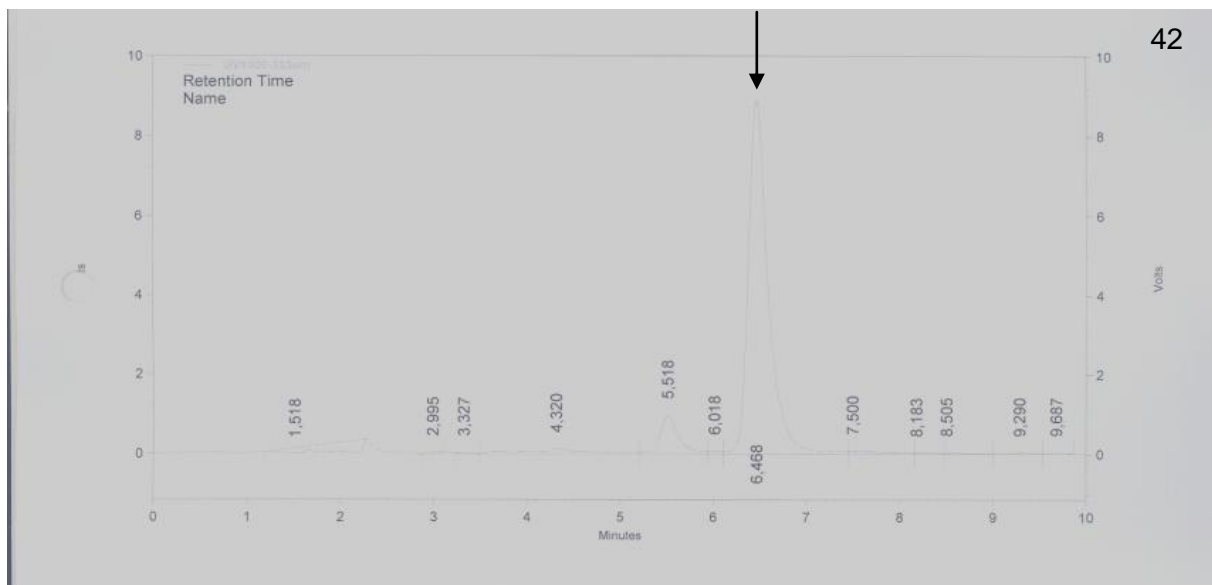


Abbildung 138: HPLC-Chromatogramme der RAS-Enzymtests nach CbRAS-Expression durch SoluBL21™ aus 1000 ml Bakteriensuspension und His-tag-Aufreinigung. 1:100-Verdünnung der Elutionsfraktion: 39: Standard: 0,5 nmol Caf-pHPL, 40: 1:100-Verdünnung der Elutionsfraktion, Inkubationszeit: 30 s, 41: 1:100-Verdünnung der Elutionsfraktion, Inkubationszeit: 15 s. Die Produkt- und Standardpeaks sind mit einem Pfeil markiert.



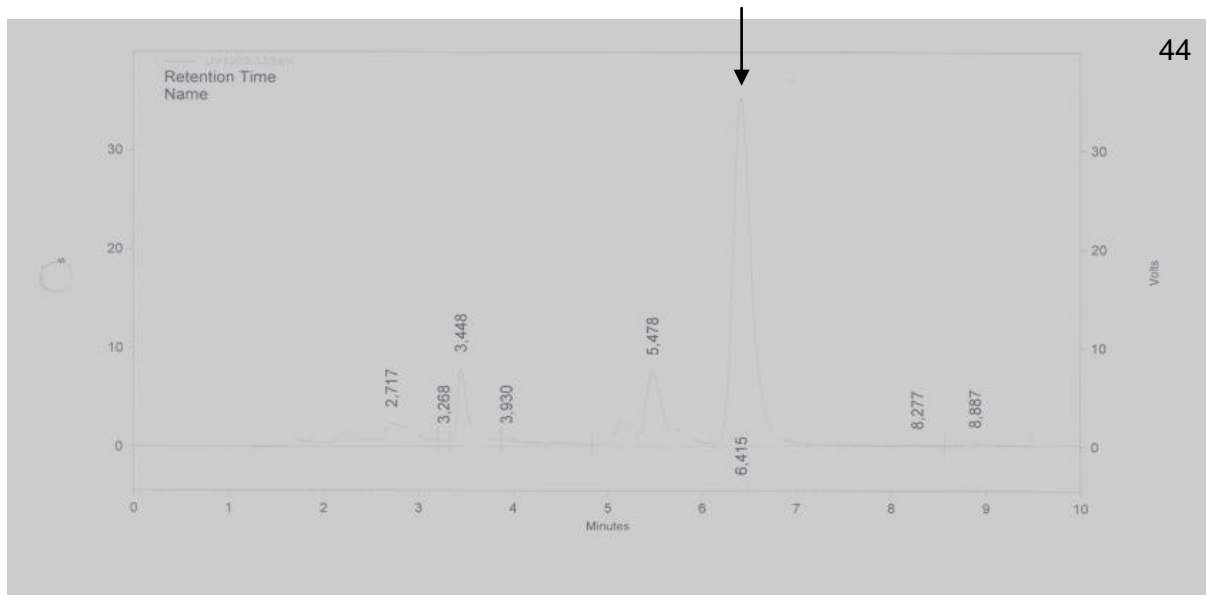
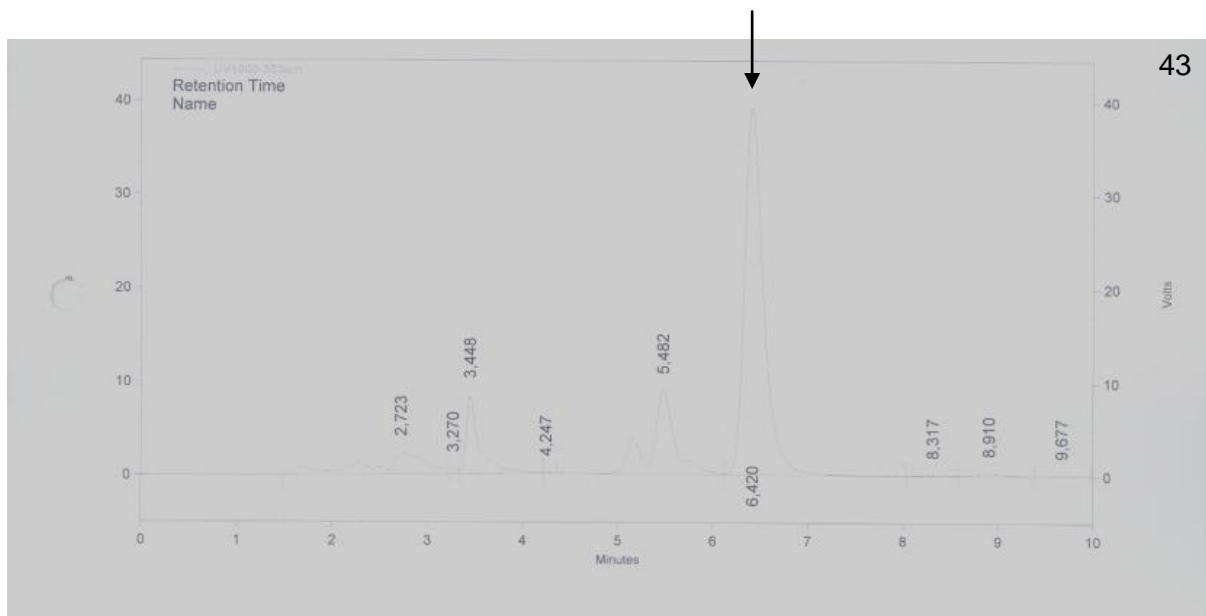
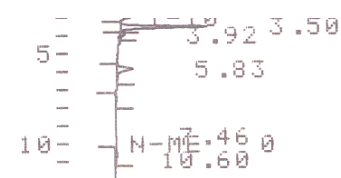
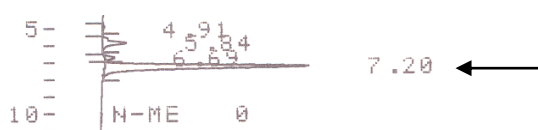
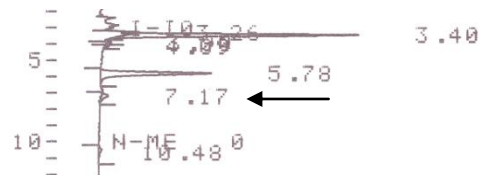


Abbildung 139 : HPLC-Chromatogramme der RAS-Enzymtests nach CbRAS-Expression durch SoluBL21TM-Zellen aus 1000 ml Bakteriensuspension, His-tag-Aufreinigung und nach HiLoadTM Superdex 75-Gelpermeationschromatographie: 42: Standard: 0,5 nmol Caf-pHPL, 43: Enzymaktivität der Fraktion 38, 44: Enzymaktivität der Fraktion 40. Die Produkt- und Standardpeaks sind mit einem Pfeil markiert

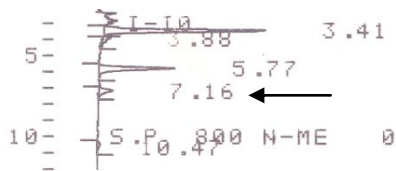


45

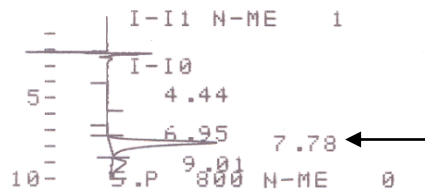
46



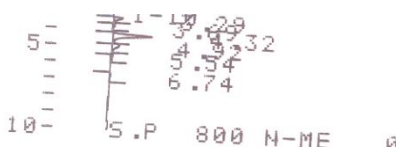
47



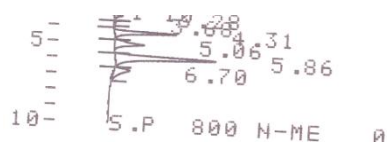
48



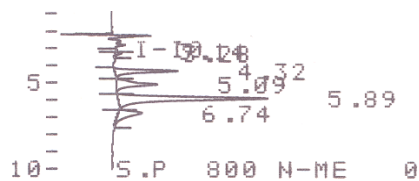
49



50



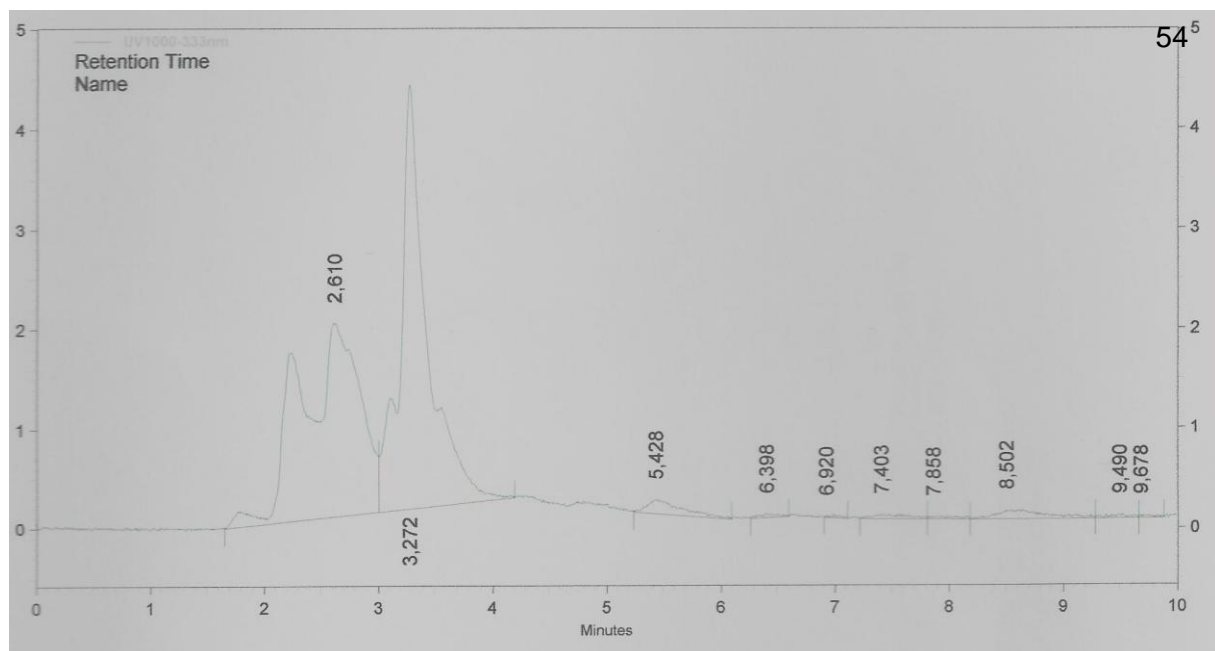
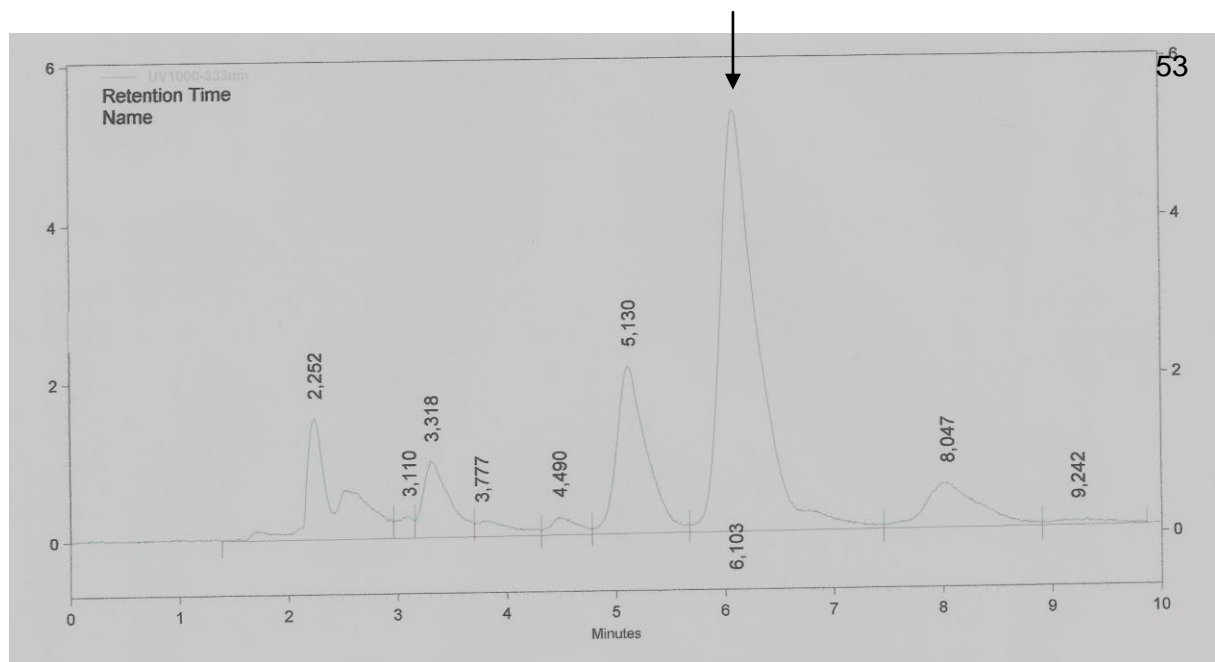
51



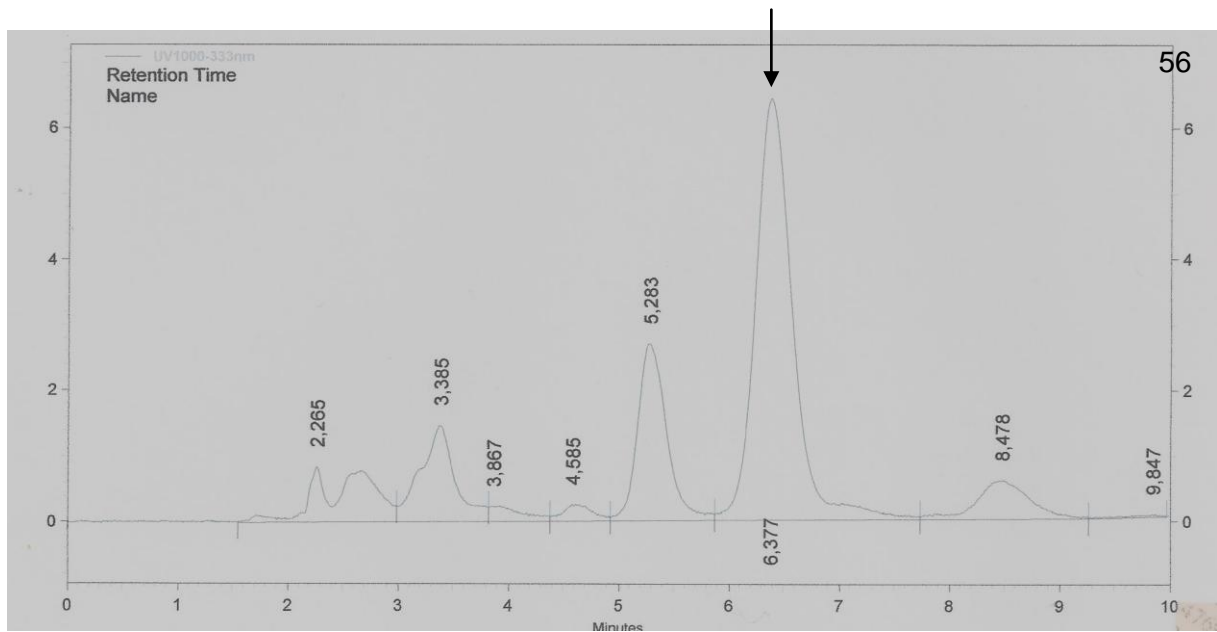
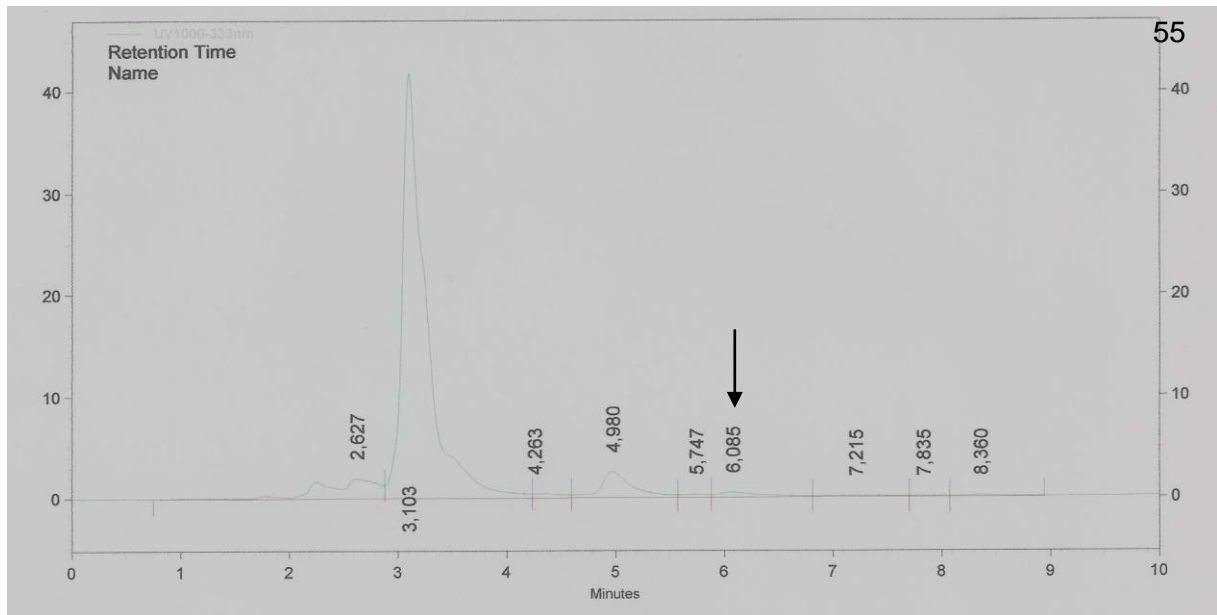
52

Abbildung 140: HPLC-Chromatogramme der 24 h-RAS- und HST-Enzymtests der RAS-HST- und HST-RAS-Chimären nach Expression in *E. coli* BL21 (DE3)pLysS: 45: Standard: 0,5 nmol Caf-pHPL, 46: Nullprobe, 47: HST-RAS, 48: RAS-HST, 49: Standard: 0,5 nmol Caf-Shikimat, 50: Nullprobe, 51: HST-RAS, 52: RAS-HST. Die Produkt- und Standardpeaks sind mit einem Pfeil markiert.

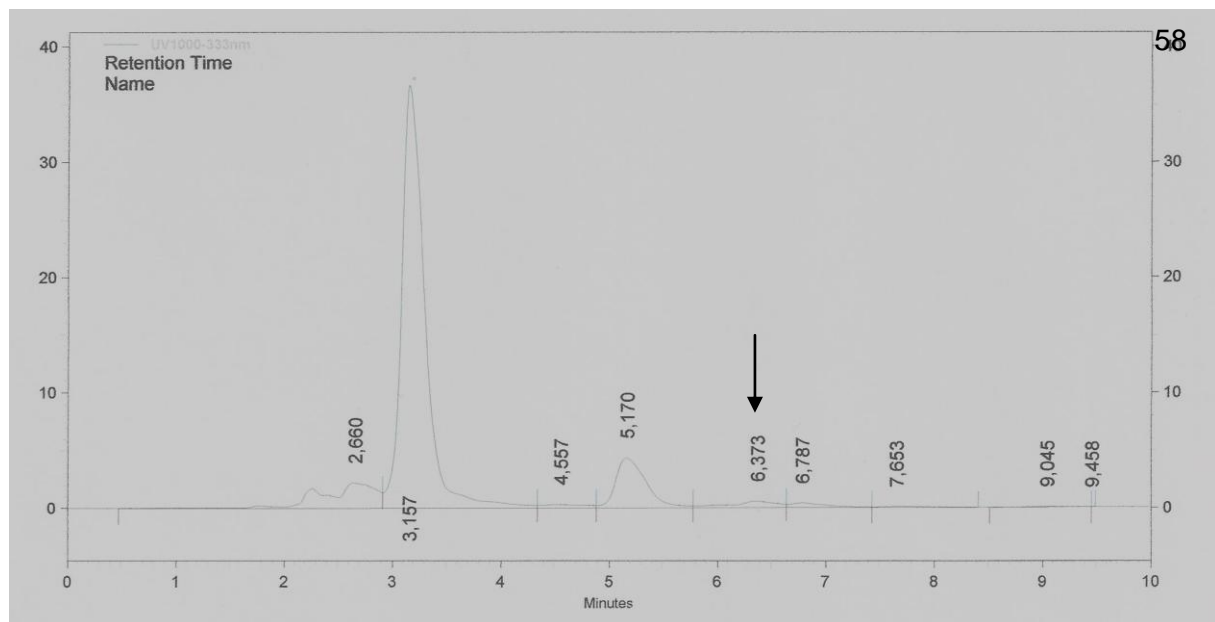
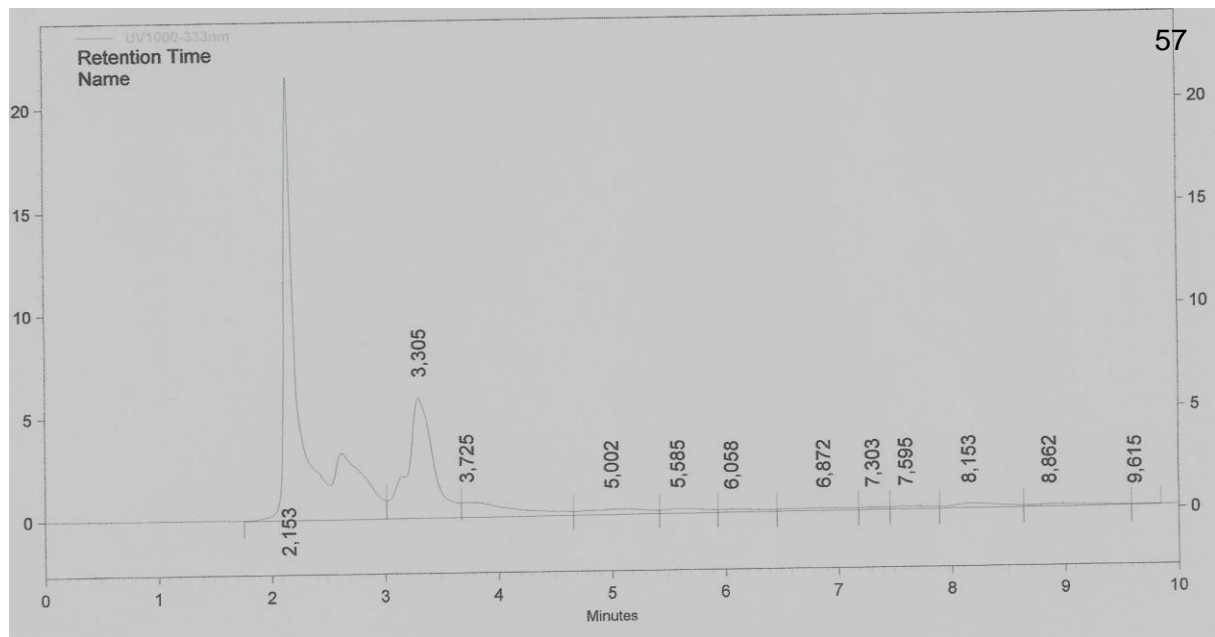
Anhang



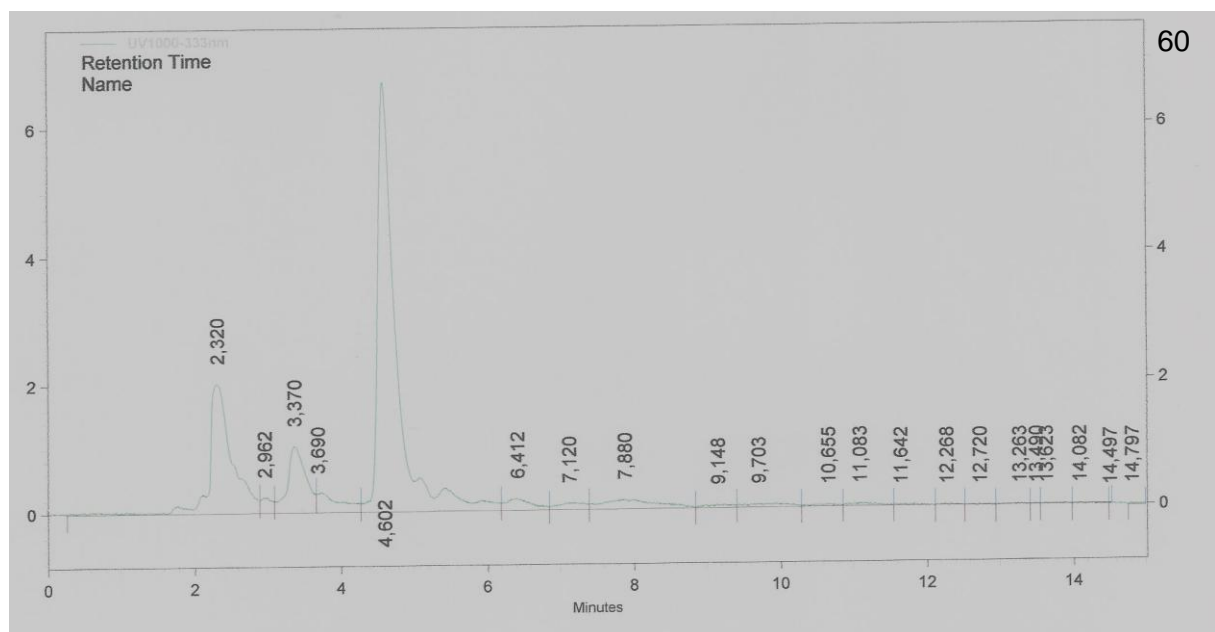
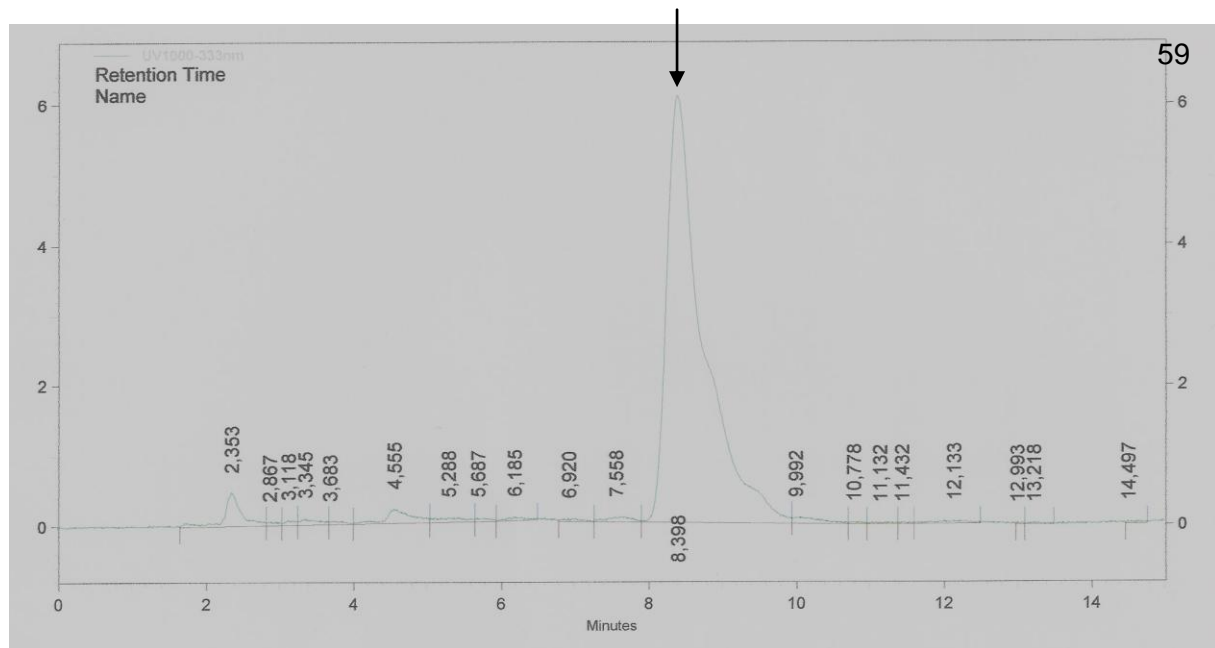
Anhang



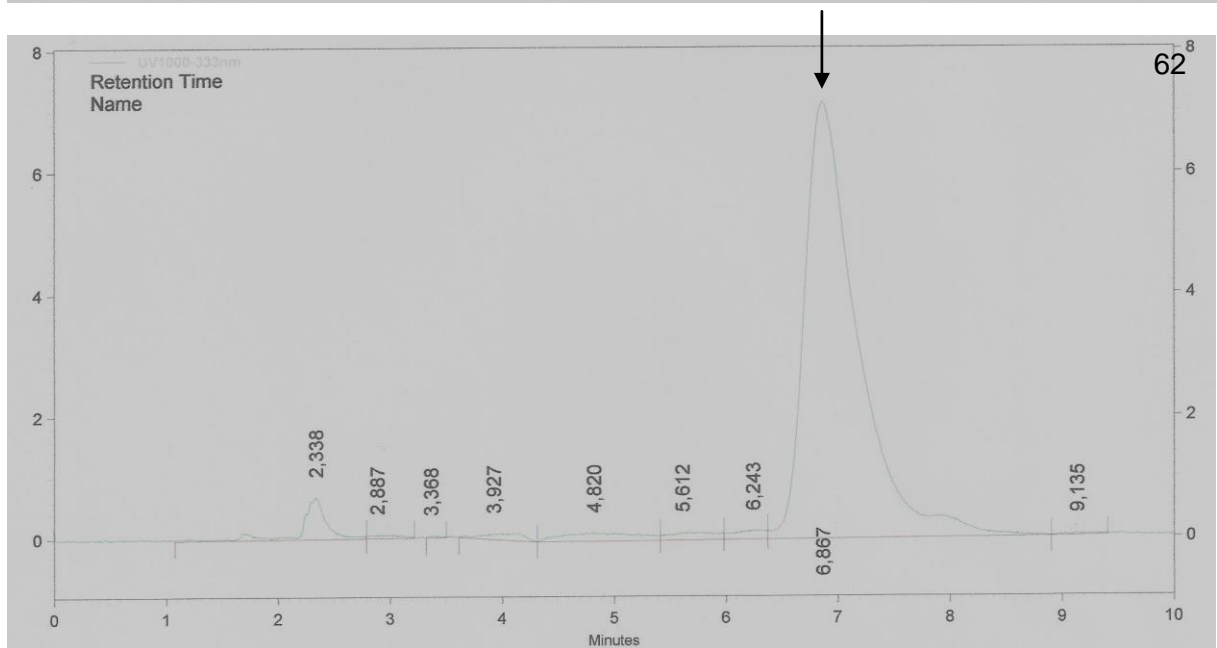
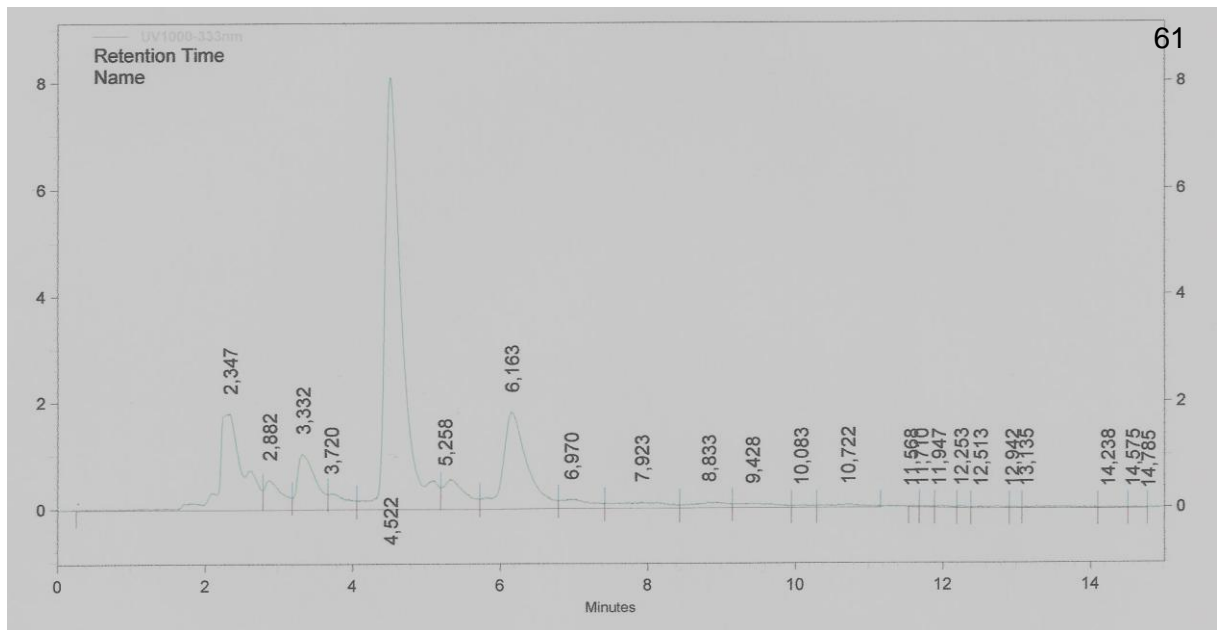
Anhang



Anhang



Anhang



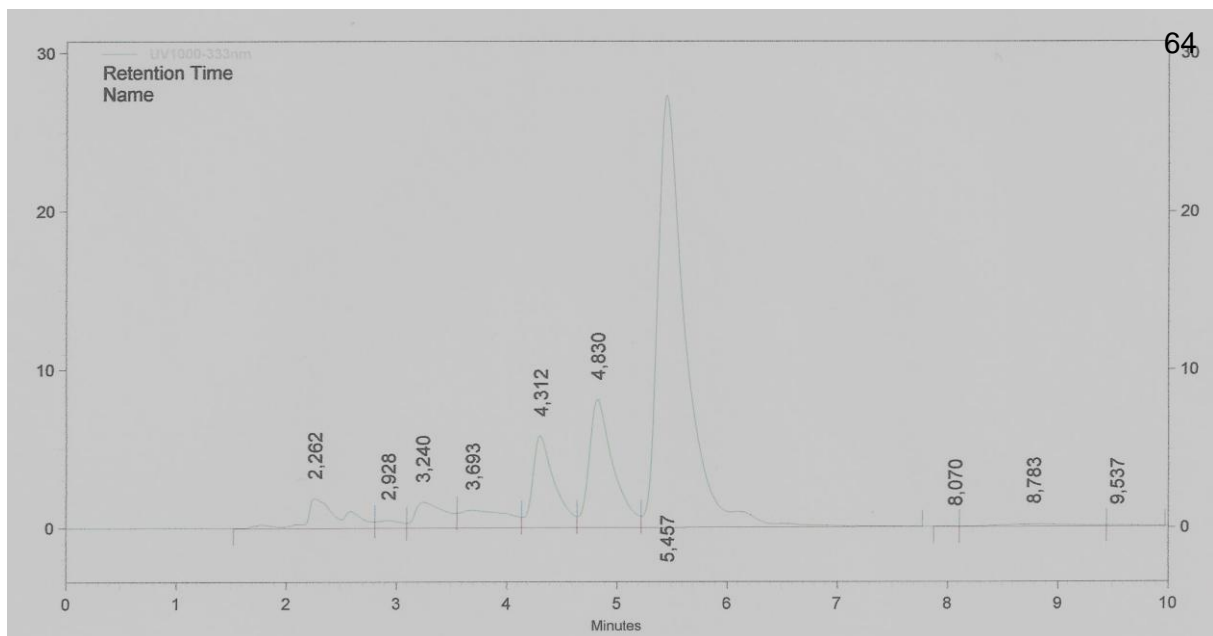
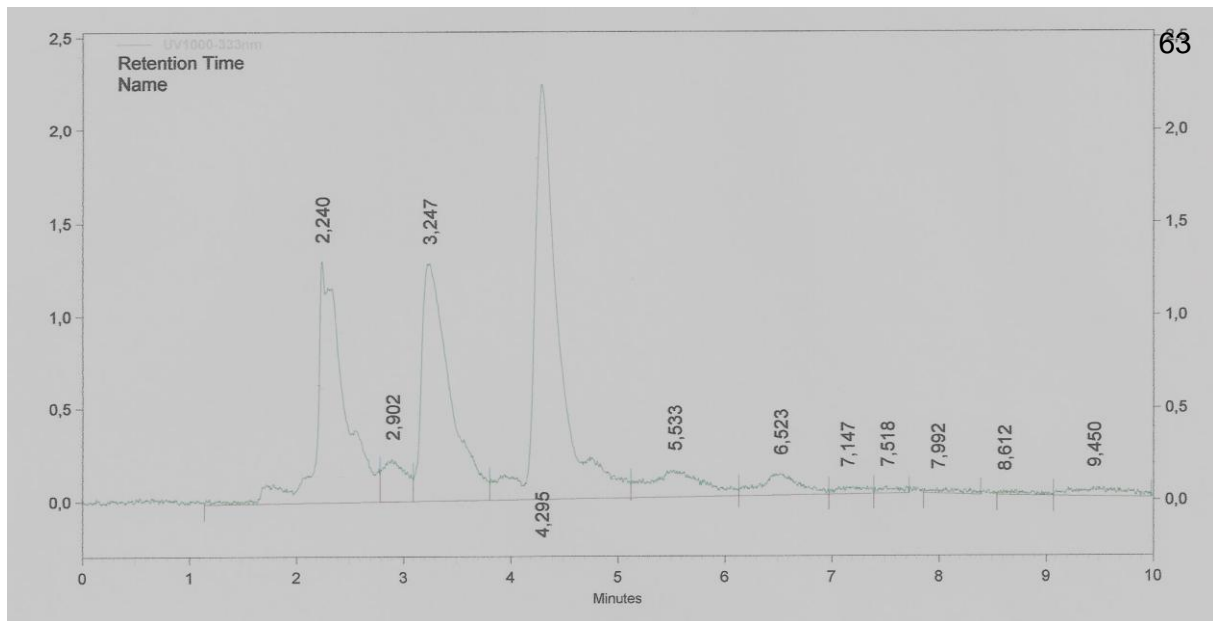
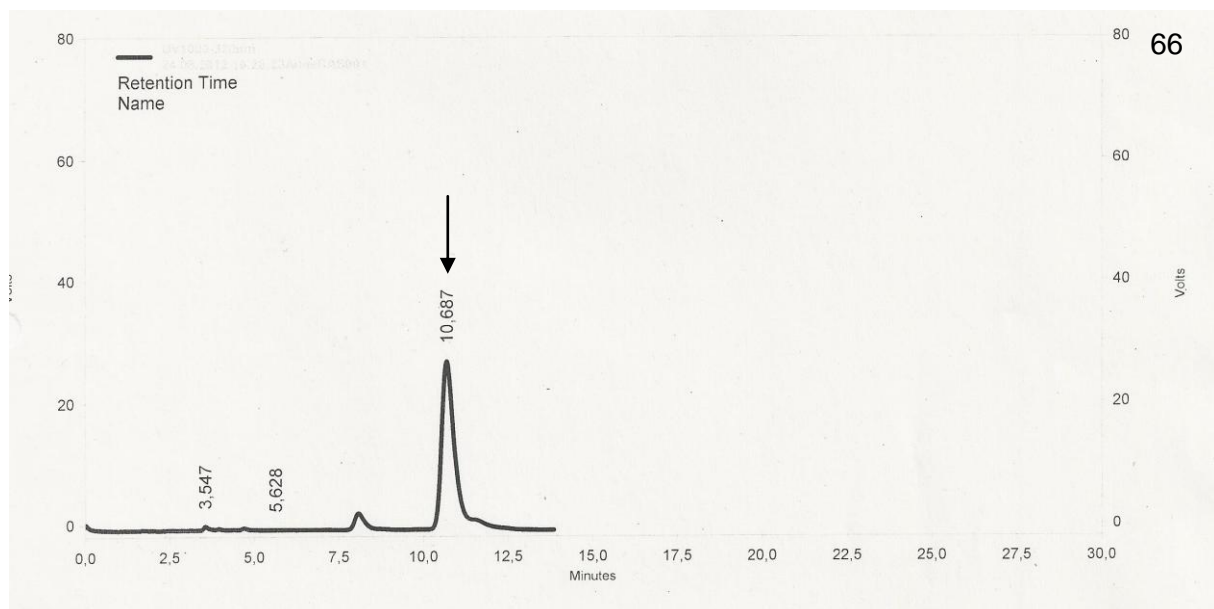
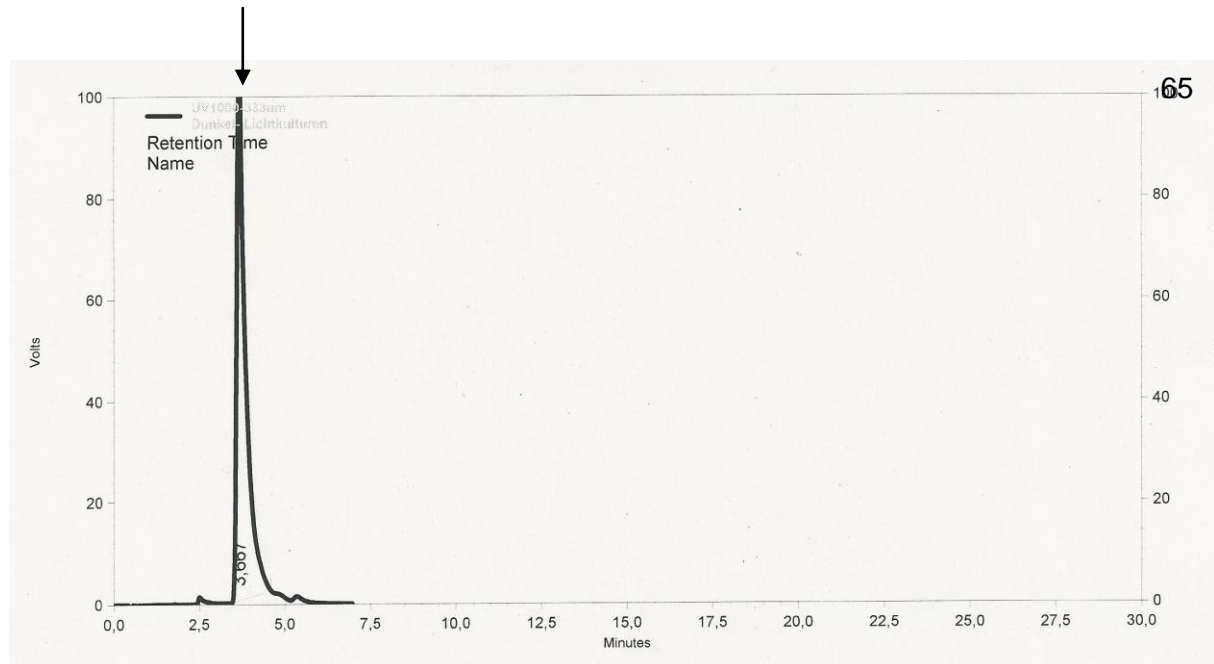
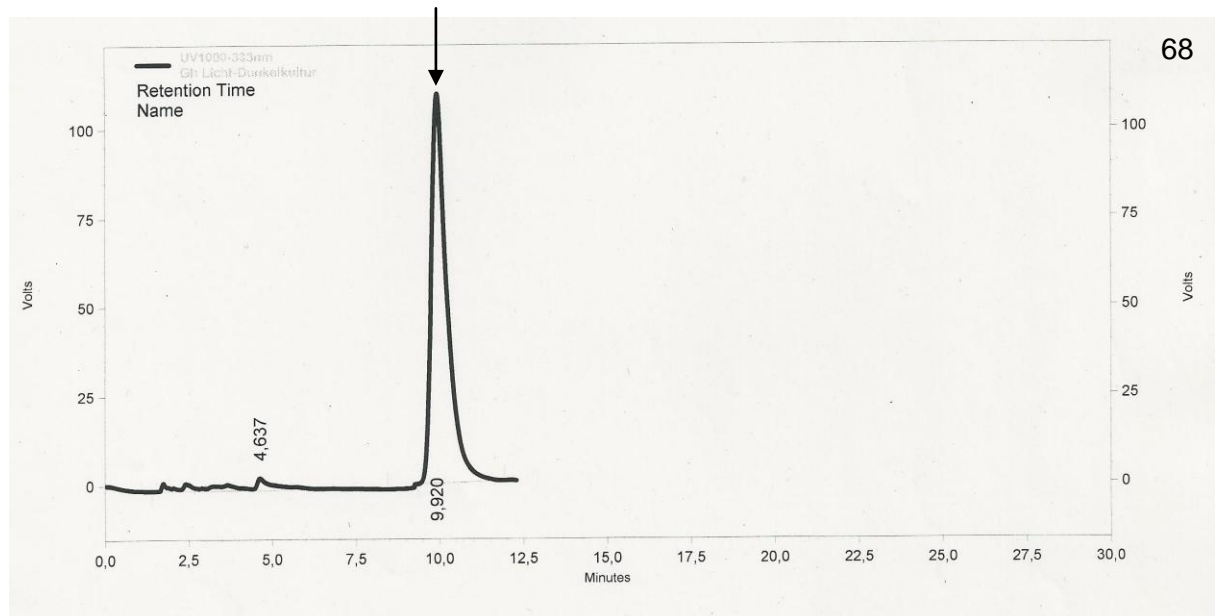
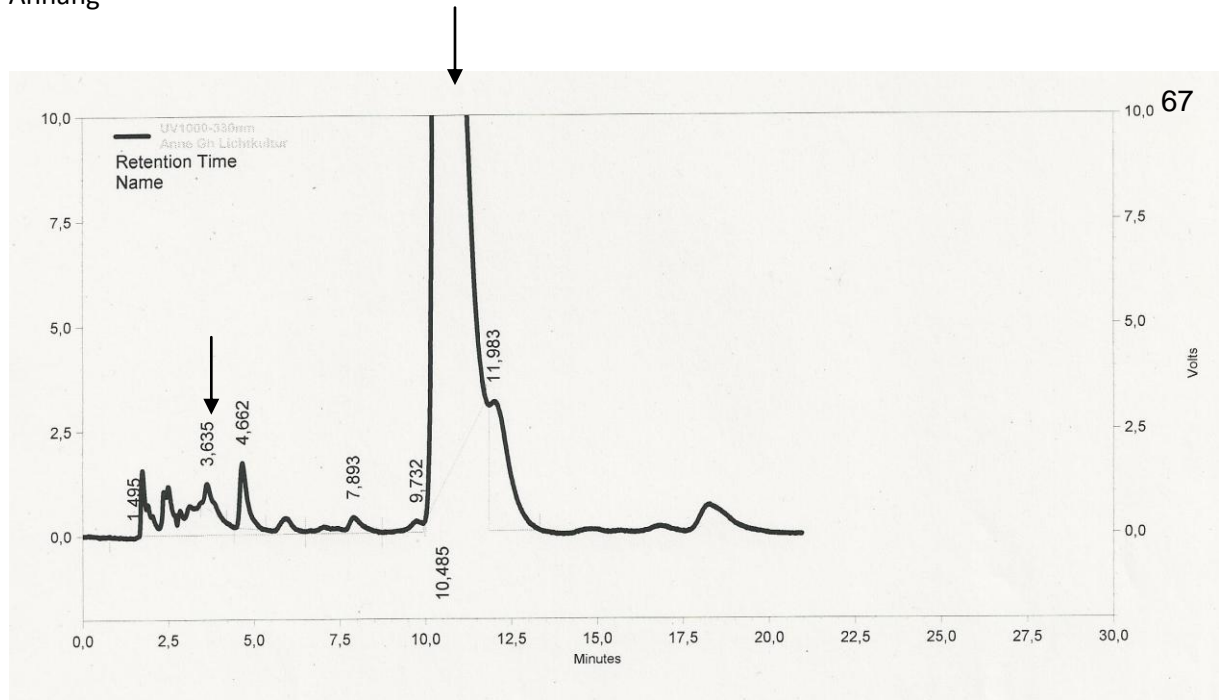


Abbildung 141: HPLC-Chromatogramme der 4 h-RAS- und HST-Enzymtests der RAS-HST- und HST-RAS-Chimären nach Expression in *E. coli* BL21 (DE3)pLysS: 53: Standard: 0,5 nmol Caf-pHPL, 54: Nullprobe, 55: RAS-HST, 56: Standard: 0,5 nmol Caf-pHPL, 57: Nullprobe, 58: HST-RAS, 59: Standard: 0,5 nmol Caf-Shikimat, 60: Nullprobe, 61: RAS-HST, 62: Standard: 0,5 nmol Caf-Shikimat, 63: Nullprobe, 64: HST-RAS. Die Produkt- und Standardpeaks sind mit einem Pfeil markiert.

Anhang



Anhang



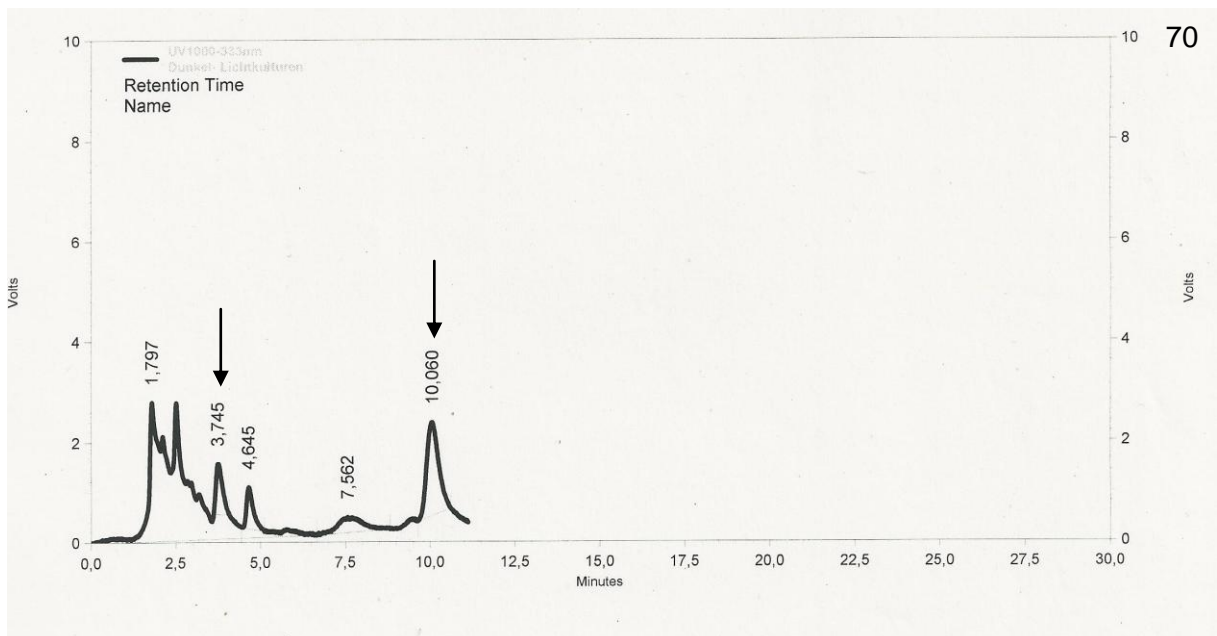
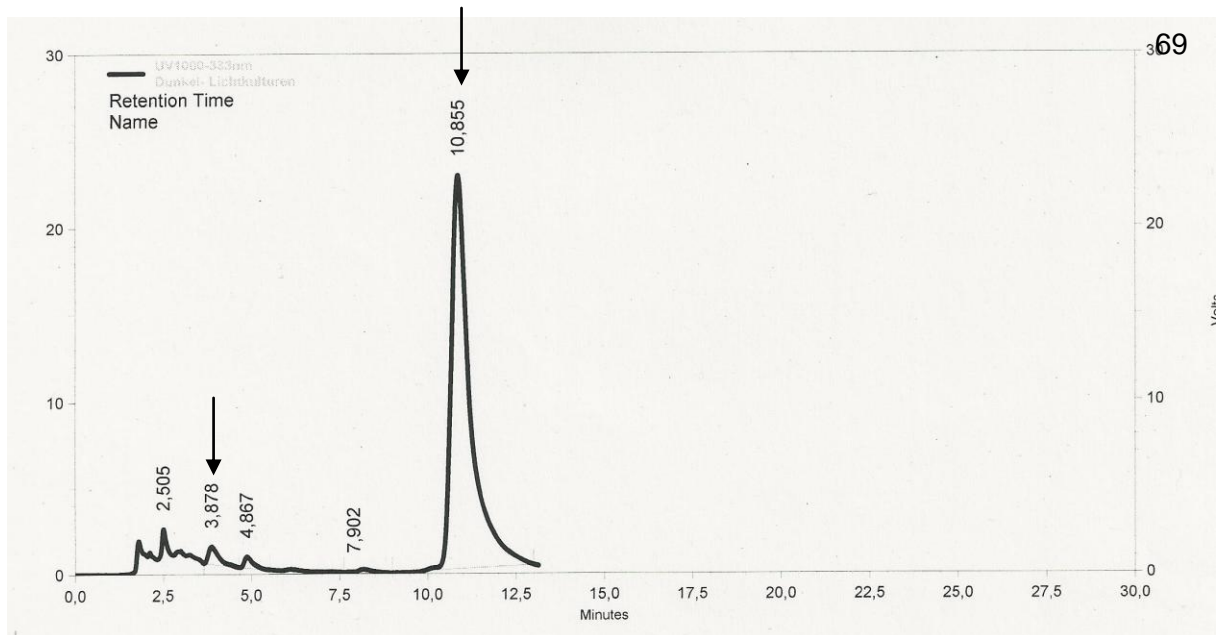
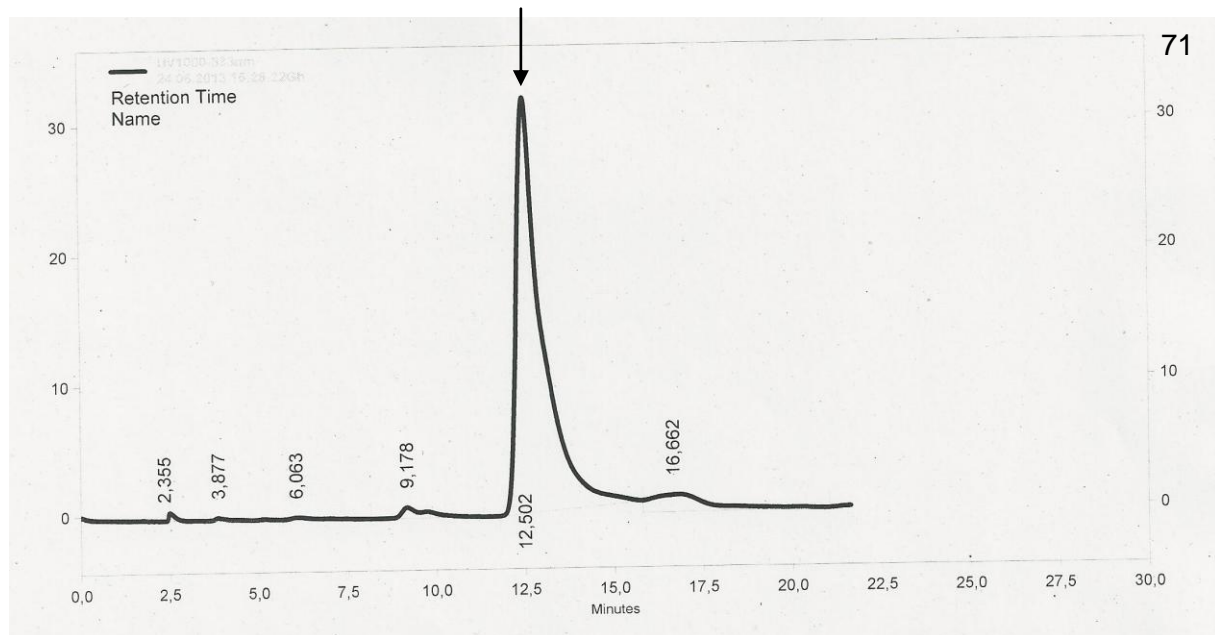
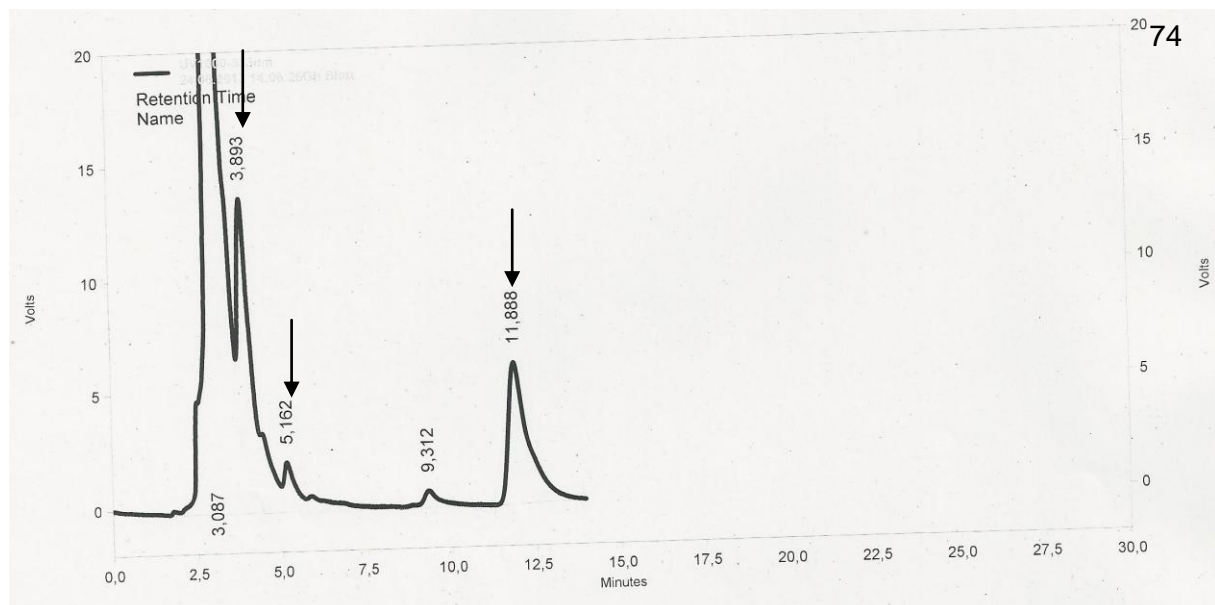
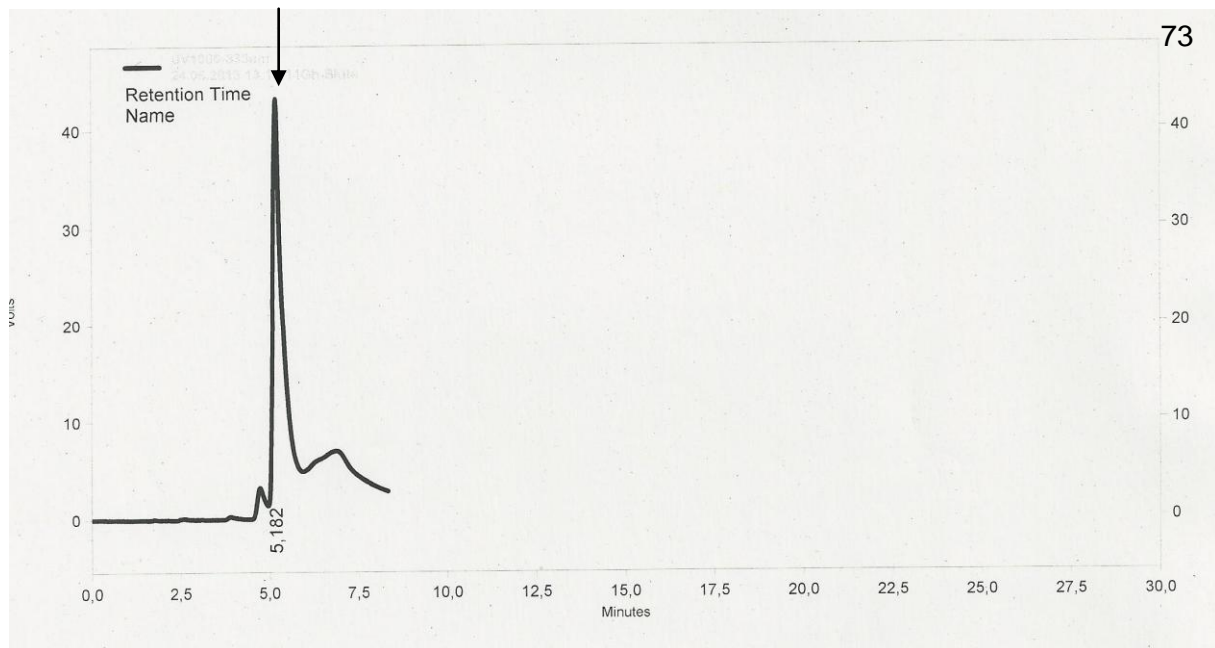


Abbildung 142: HPLC-Chromatogramme der Bestimmung von Dunkel- und Lichtkulturen in *Glechoma hederacea*: 65: Standard: Chlorogensäure, 66: Standard: Rosmarinsäure, 67: Lichtkultur 7 d, 68: Dunkelkultur 7 d; 69: Lichtkultur 14 d, 70: Dunkelkultur 14 d. Die Standard- und Produktpeaks sind mit einem Pfeil markiert.

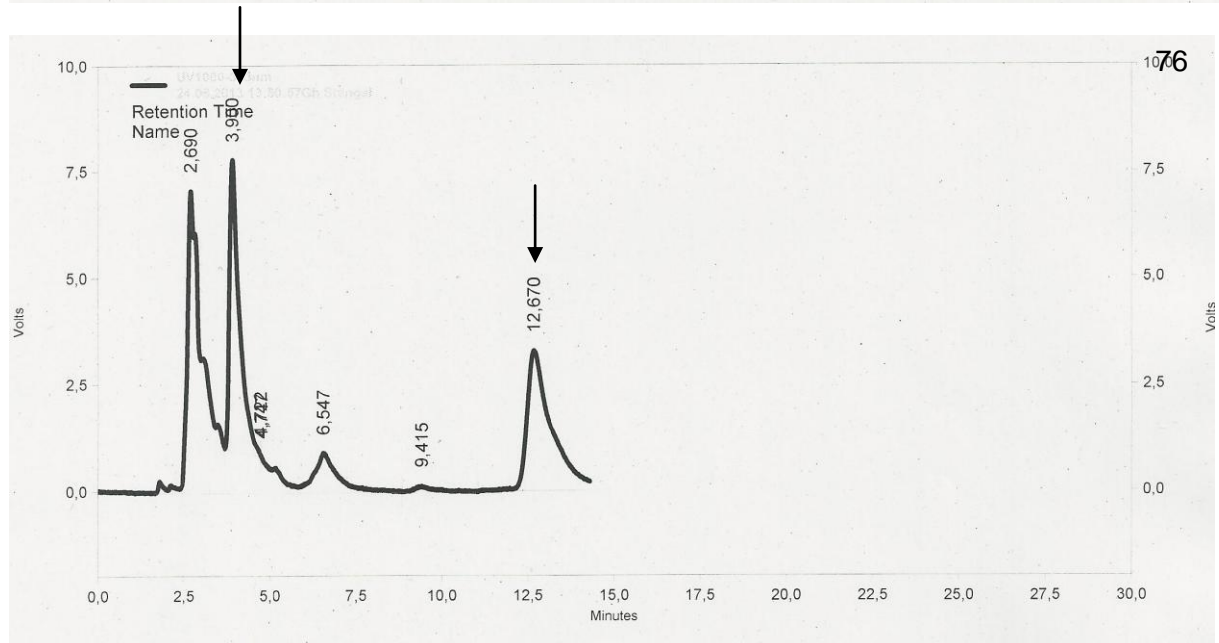
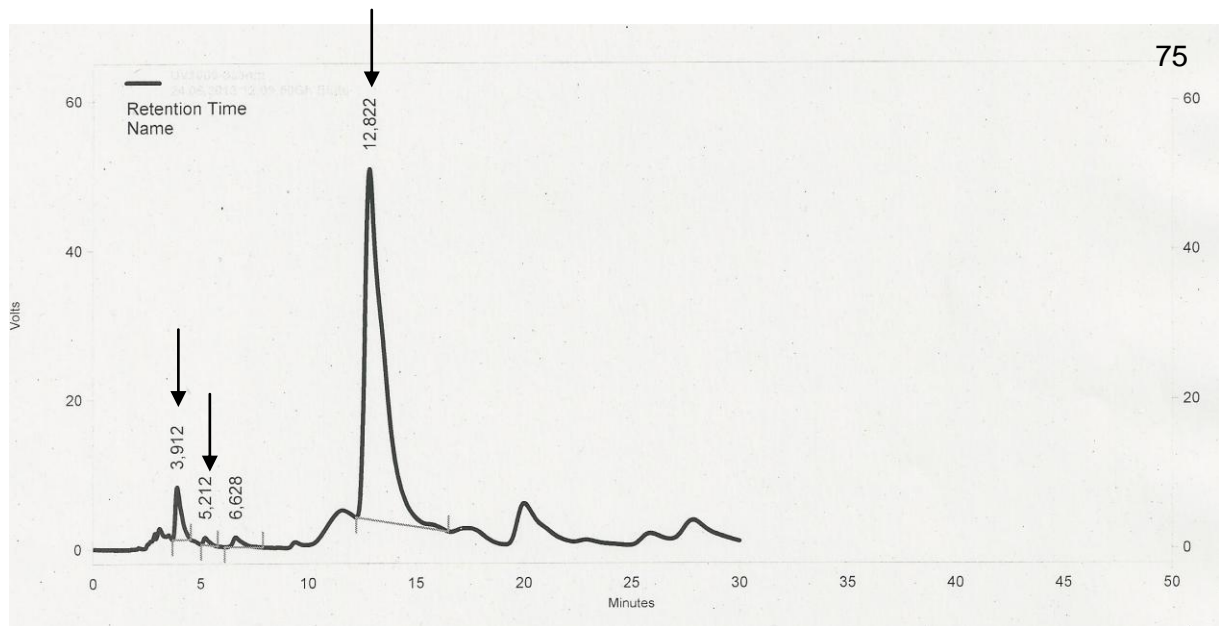
Anhang



Anhang



Anhang



Anhang

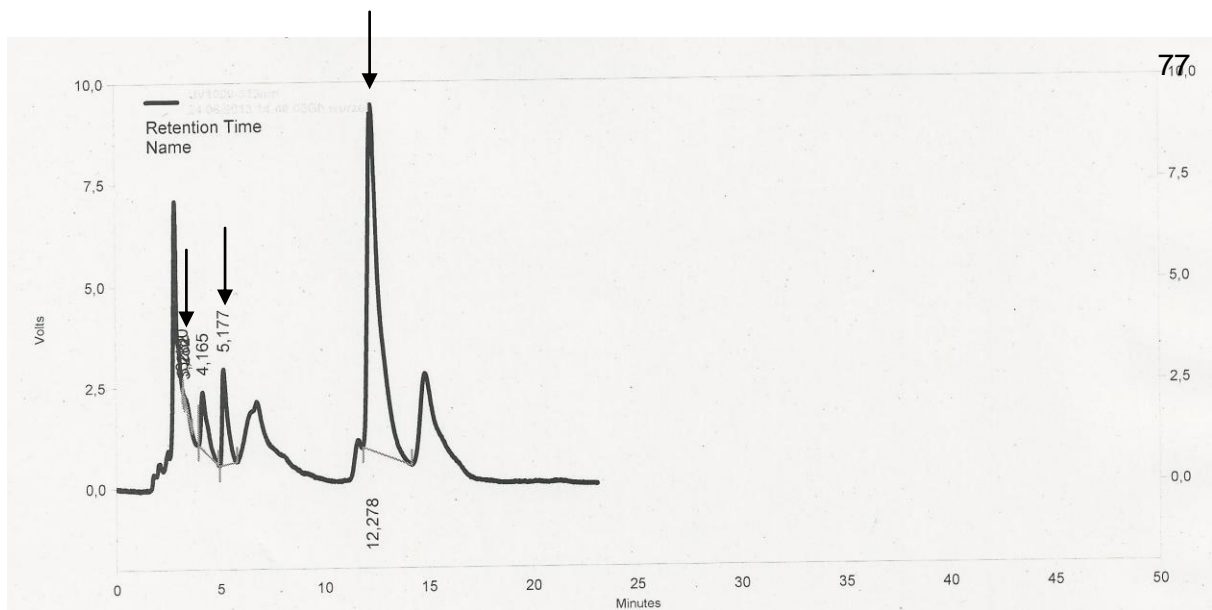
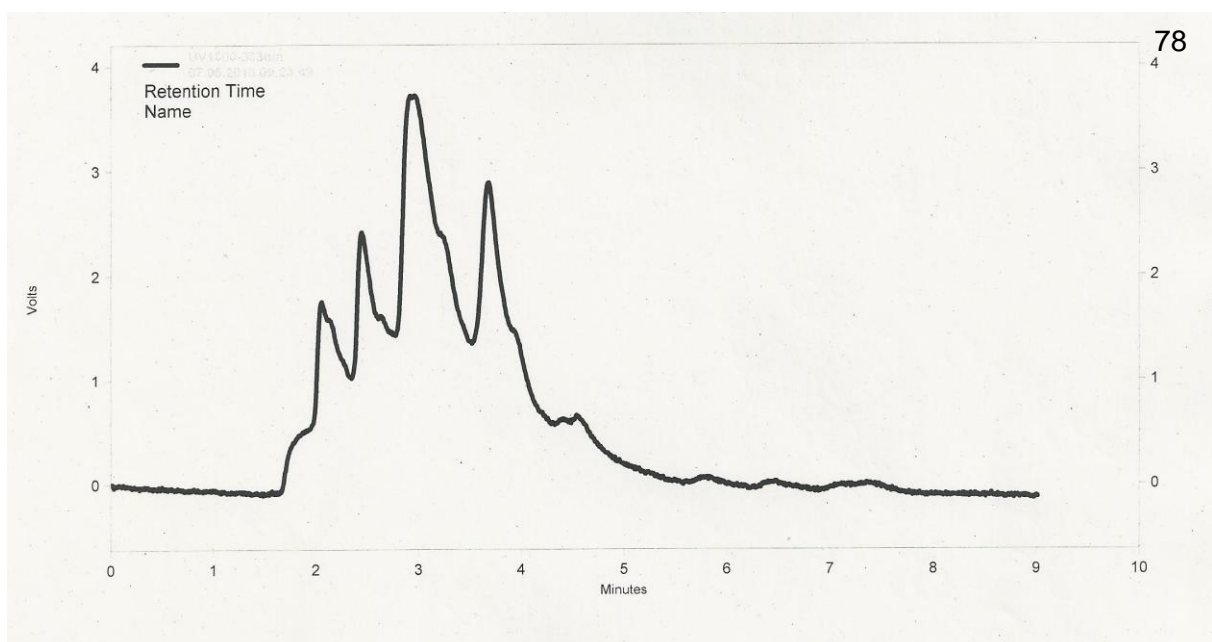
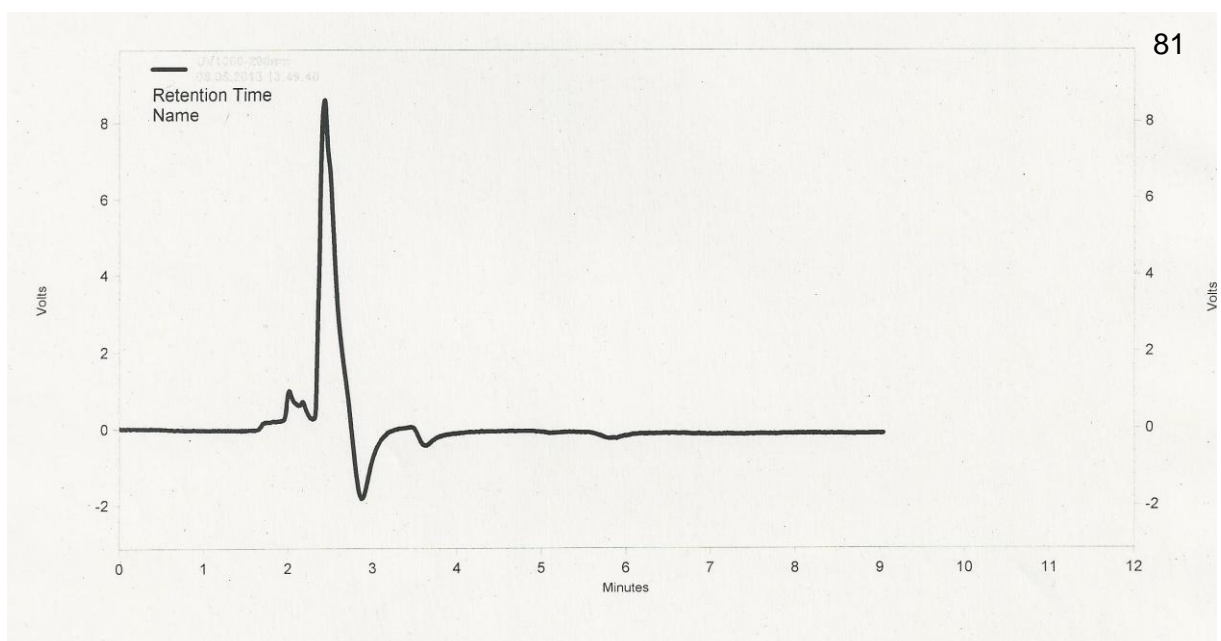
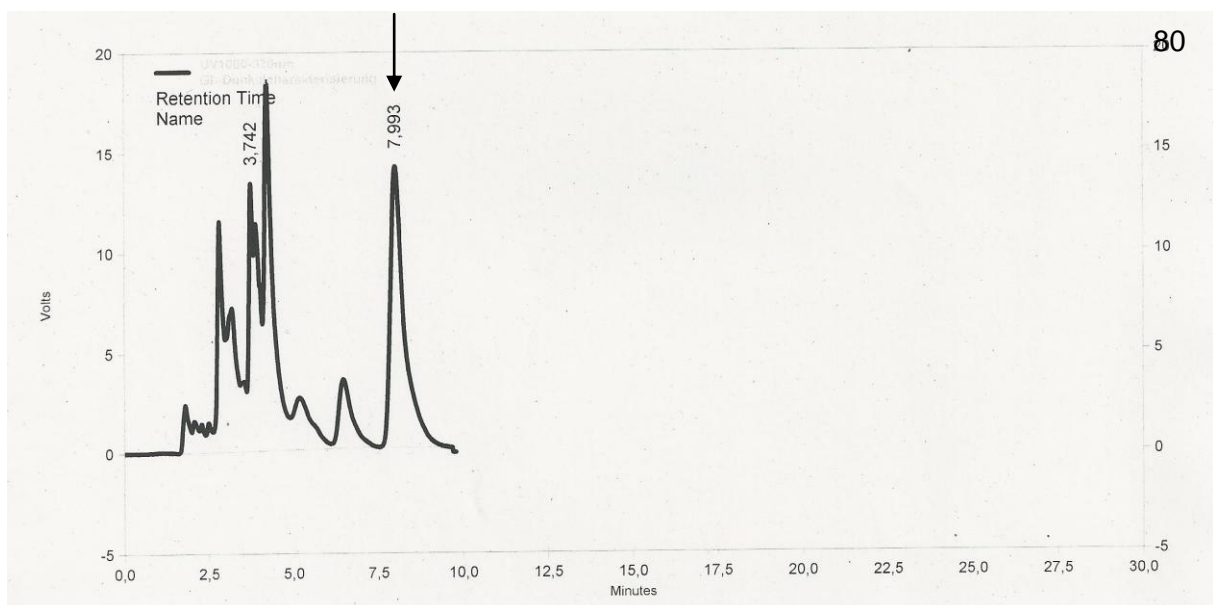
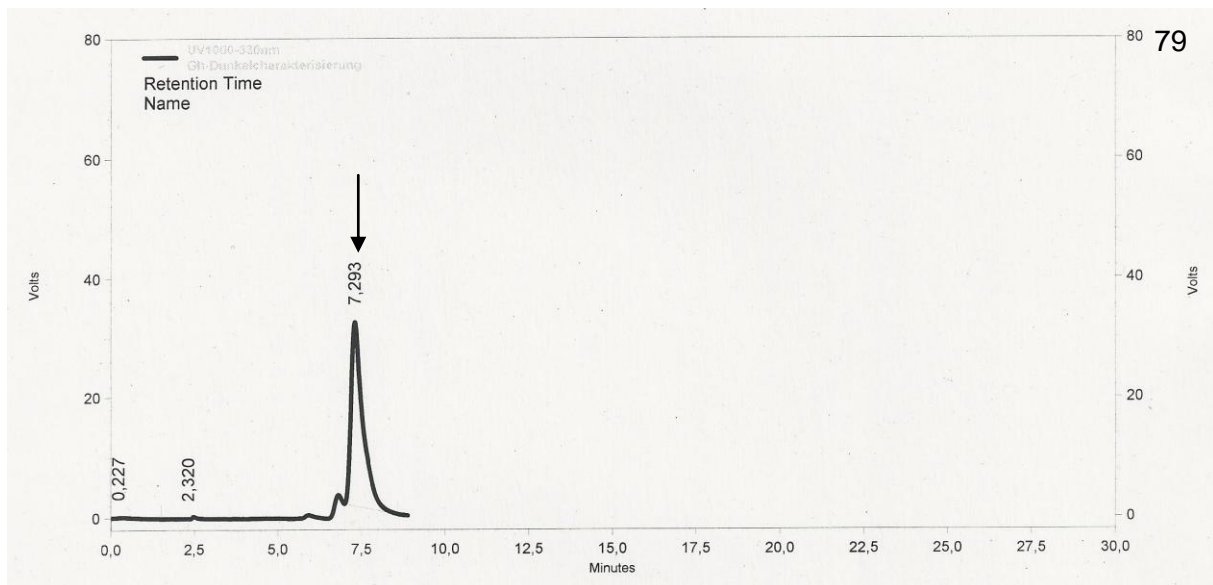
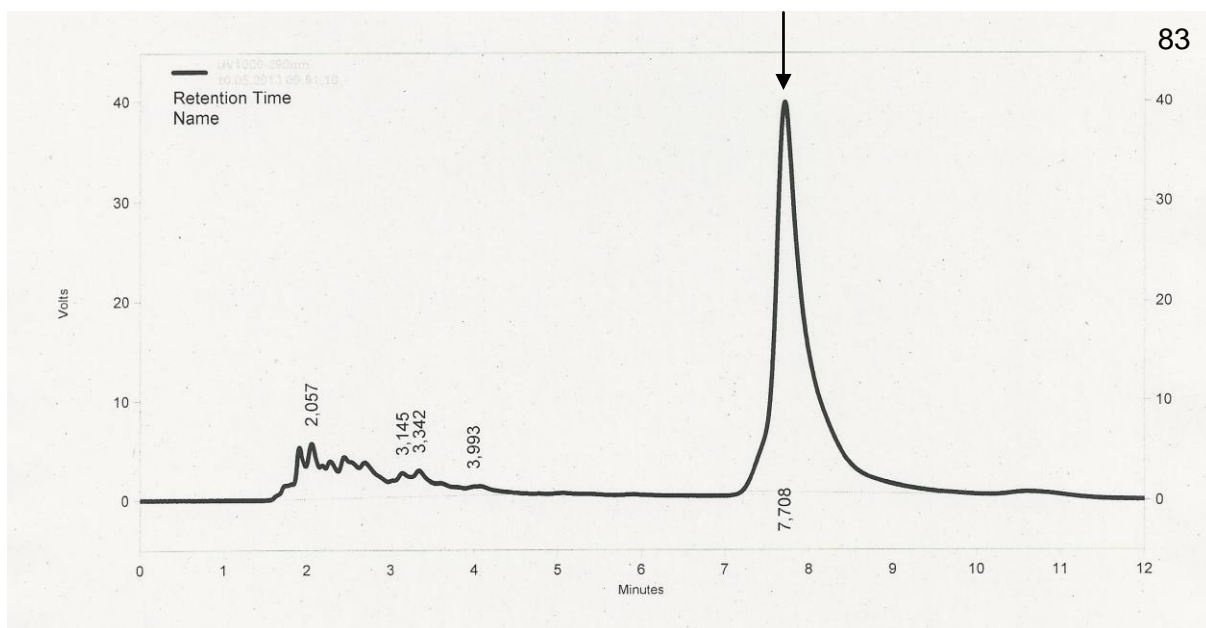
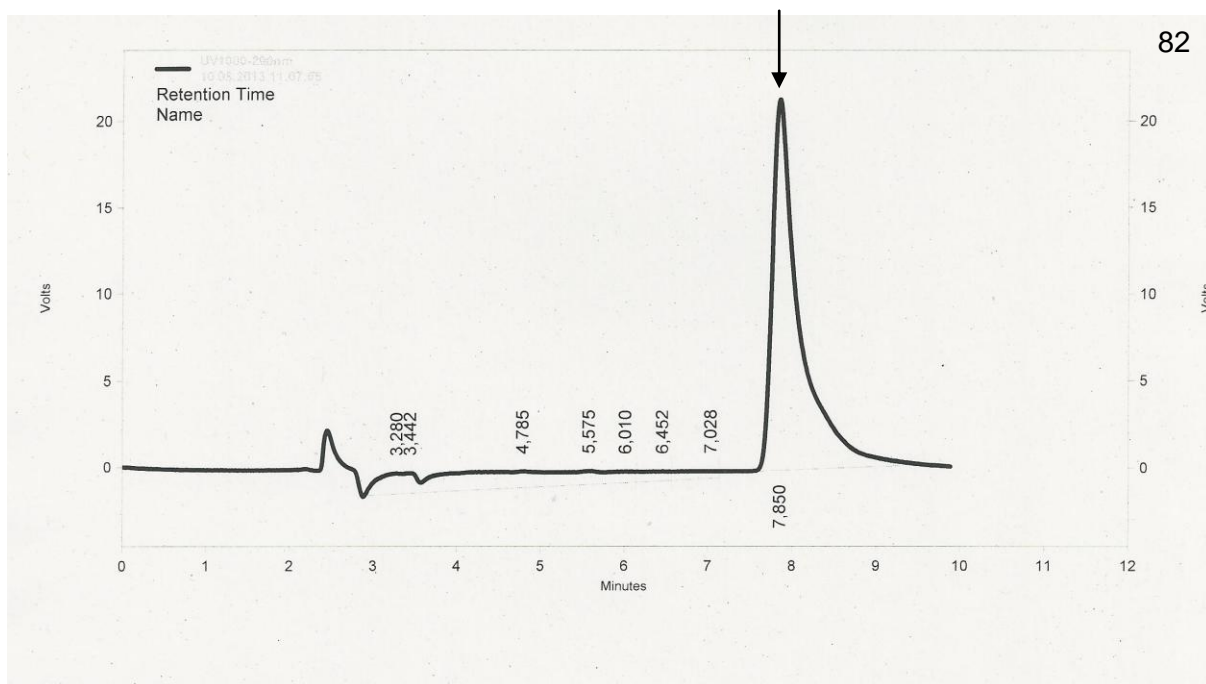


Abbildung 144: HPLC-Chromatogramme der Bestimmung von Rosmarinsäure-, Chlorogensäure- und Kaffeesäure-Gehalte in *Glechoma hederacea*: 71: Standard: Rosmarinsäure, 72: Standard: Chlorogensäure, 73: Standard: Kaffeesäure, 74: Blatt; 75: Blüte, 76: Stängel, 77: Wurzel. Die Produkt- und Standardpeaks sind mit einem Pfeil markiert.

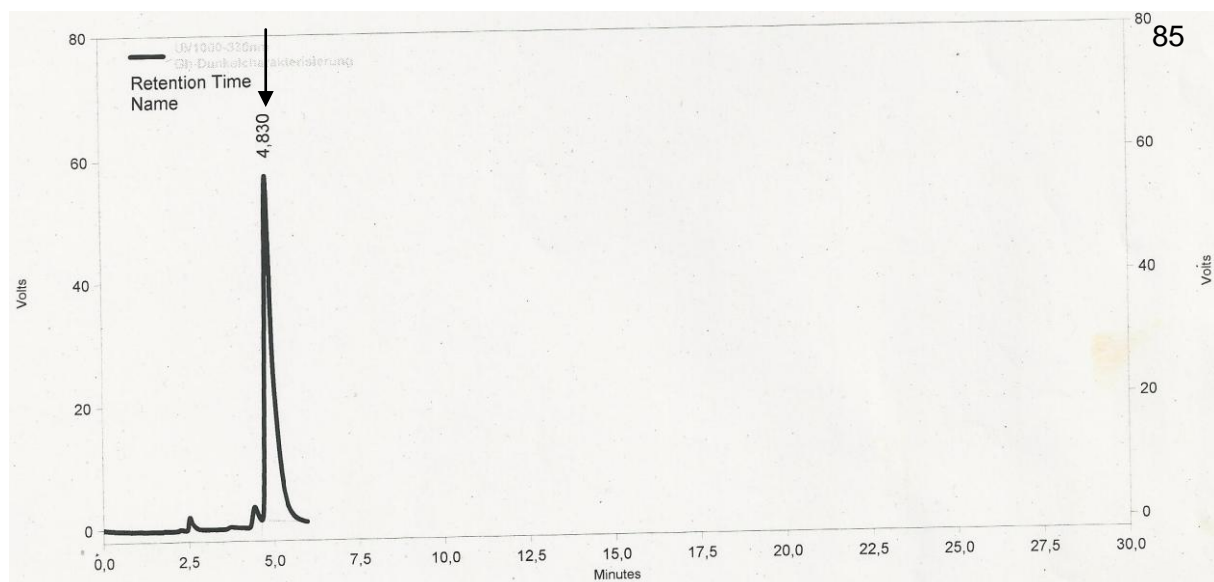
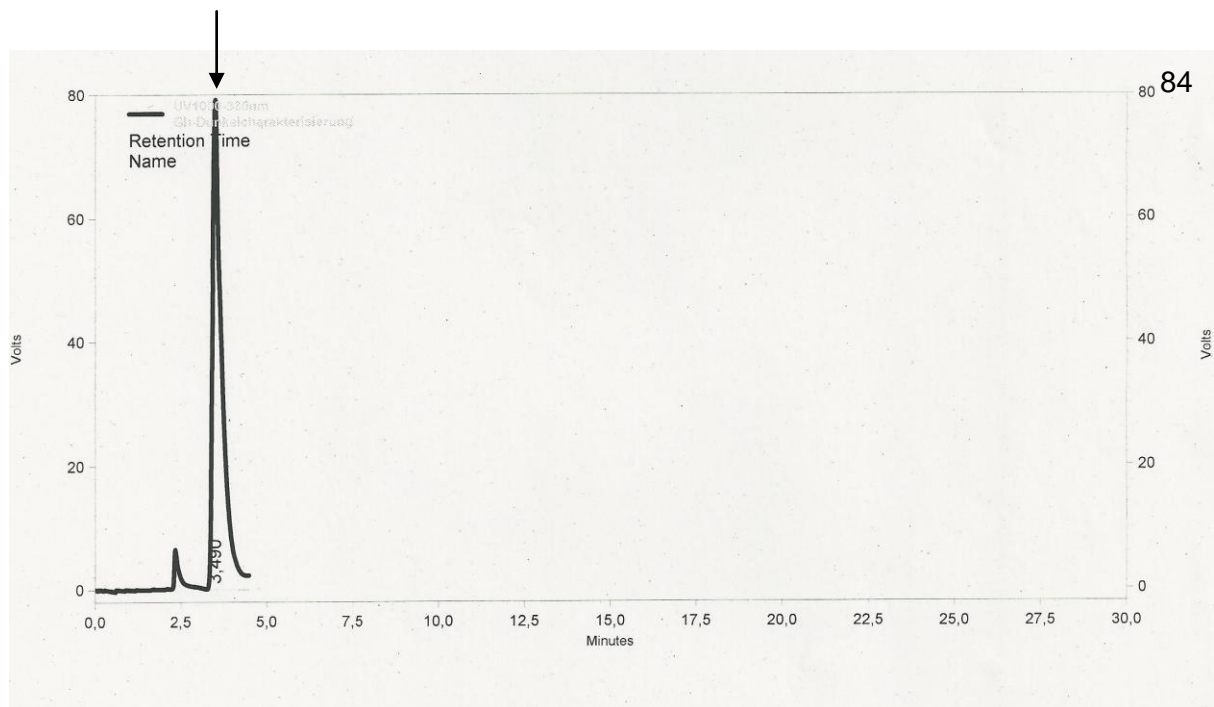


Anhang





Anhang



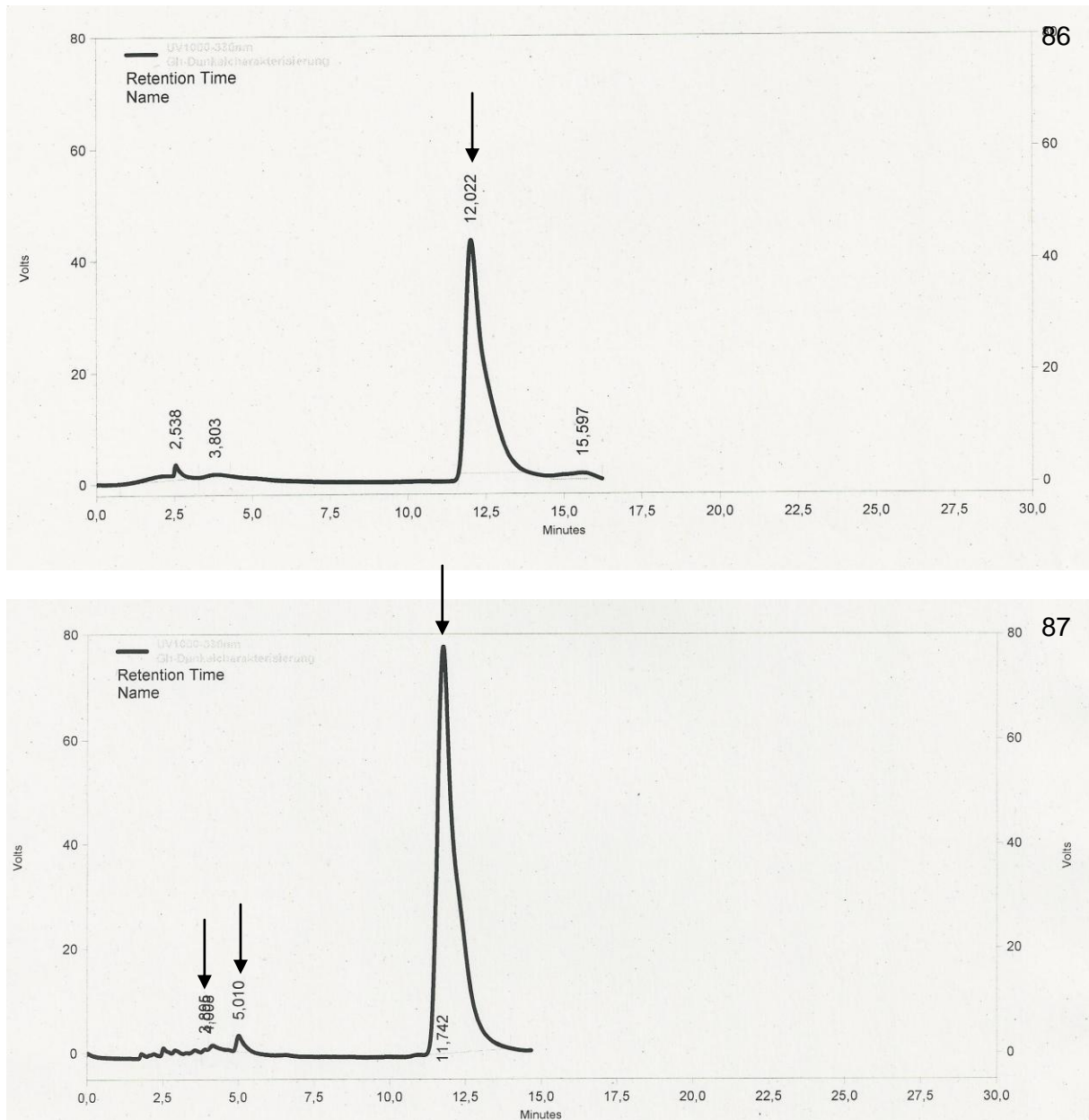
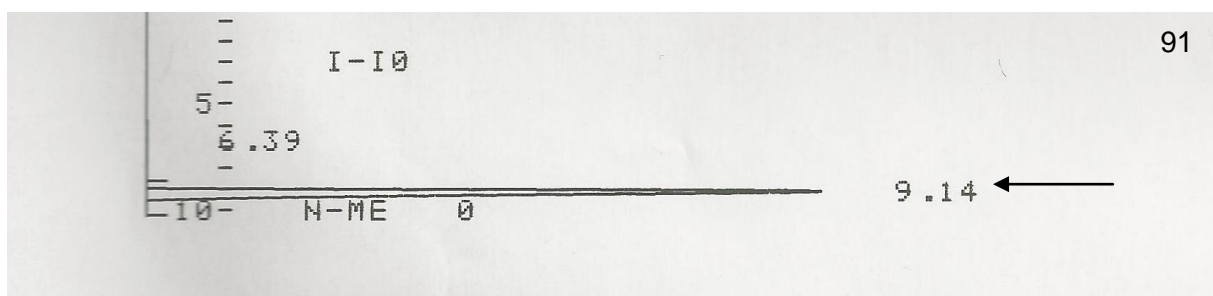
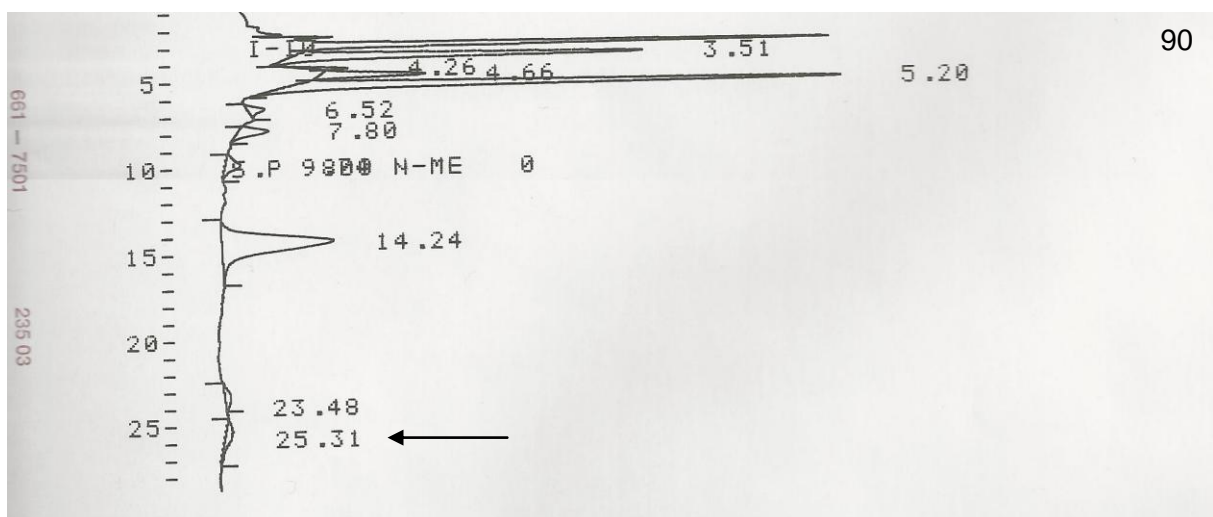
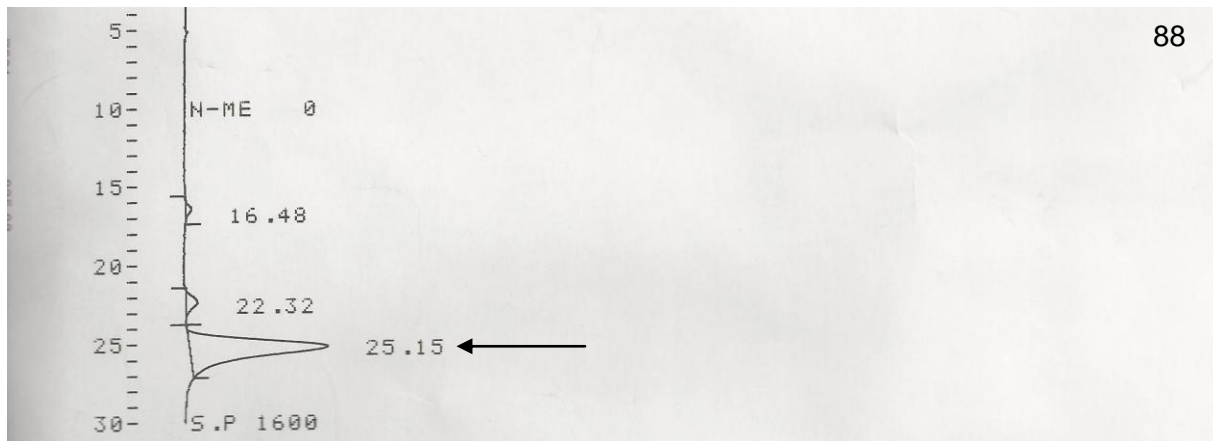


Abbildung 144: HPLC-Chromatogramme der Bestimmung der RAS- und PAL-Aktivität und der Chlorogensäure-, Rosmarinsäure- und Kaffeesäure-Gehalte in *Glechoma hederacea*: 78: Nullprobe, 79: Standard: Caf-pHPL, 80: Probe, 81: Nullprobe, 82: Standard: *t*-Zimtsäure, 83: Probe, 84: Chlorogensäure, 85: Kaffeesäure, 86: Rosmarinsäure, 87: Probe. Die Produkt- und Standardpeaks sind mit einem Pfeil markiert.



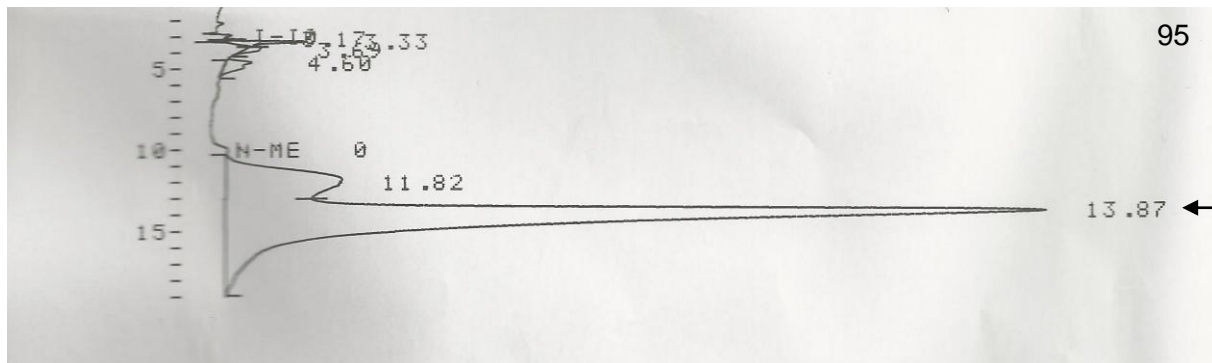
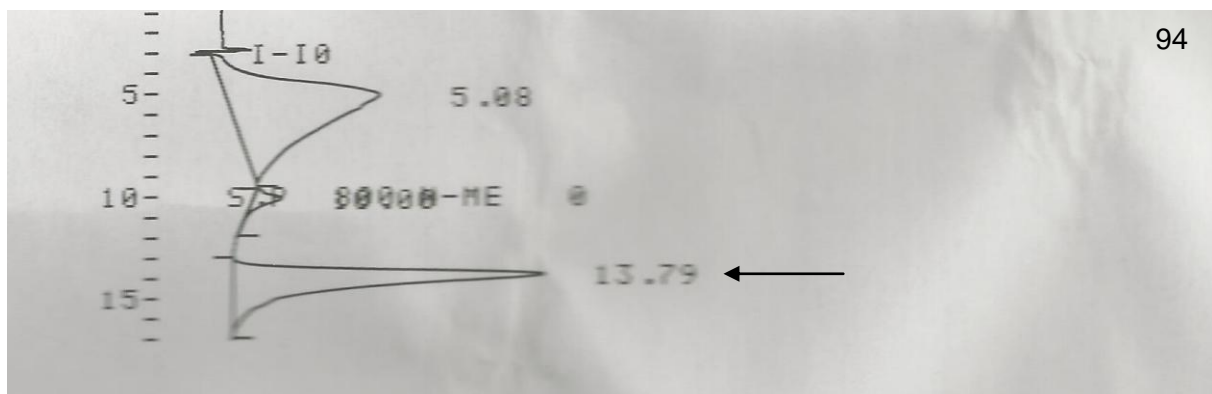
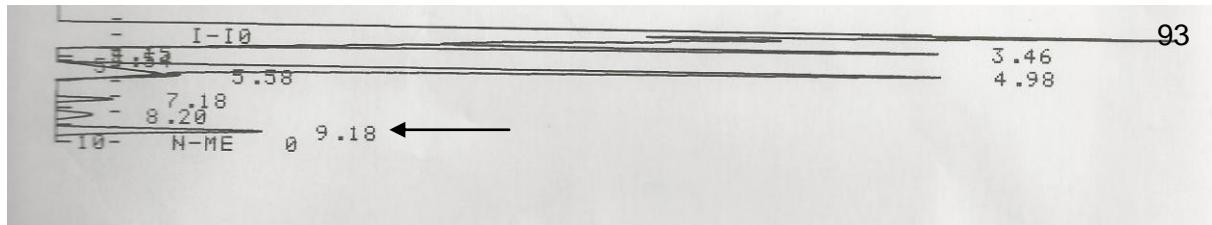
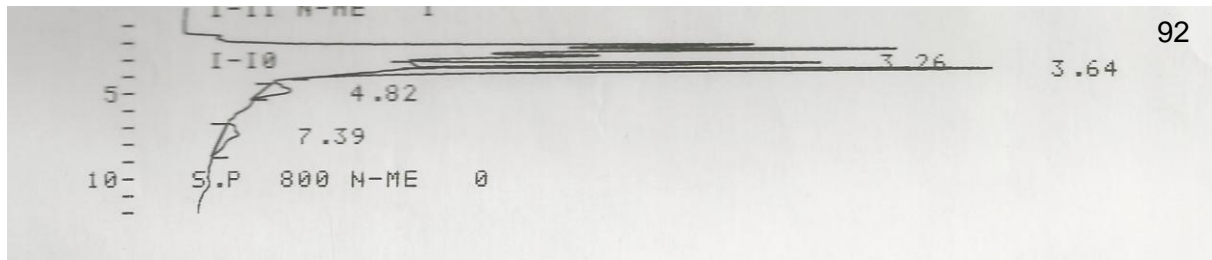


Abbildung 145: HPLC-Chromatogramme der Bestimmung der RAS- und PAL-Aktivität und des Rosmarinsäure-Gehalts in *Melissa officinalis*: 88: Standard: Caf-pHPL, 89: Standard: Nullprobe, 90: Probe, 91: Standard: *t*-Zimtsäure, 92: Nullprobe, 93: Probe, 94: Standard: Rosmarinsäure, 95: Probe. Die Produkt- und Standardpeaks sind mit einem Pfeil markiert.

Danksagung

In diesem Abschnitt möchte ich all denjenigen danken, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben

Zuerst möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Maike Petersen für ihre exzellente Betreuung und für die vielen Gespräche bedanken, die auch auf nicht-wissenschaftlicher Ebene stattfanden. Im Besonderen danke ich Dir, für die Möglichkeit, in Italien forschen zu dürfen, was meine persönliche Entwicklung enorm beeinflusst hat.

Herrn Prof. Dr. Klaus Reuter danke ich besonders für die Übernahme der Zweitkorrektur. Dem Kristallographie-Team um Prof. Dr. Klaus Reuter und Prof. Dr. Gerhard Klebe danke ich für die Unterstützung bei meinen Kristallographieversuchen.

Bei Prof. Giacomo Lorenzini, Prof. Cristina Nali, Alessandra Campanella, Dr. Alice Trivellini, Simona Cinagherotti und Andrea Parrini bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme in einem anderen Land und für das Einführen in vollkommen neue Forschungsbereiche. Explizit möchte ich mich bei Dr. Elisa Pellegrini für ihre Freundschaft und Hilfe, v.a. bei den statistischen Analysen und bei Michele Della Bartola für die Einführungen in die Real-time-PCR bedanken.

Herrn Walter Rudl danke ich für die Pflege meiner *Glechoma*-Pflanzen und für die vielen Gespräche.

Auch möchte ich mich bei allen (ehemaligen) Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie bedanken. Mein besonderer Dank geht an Aili, Beate, Elke, Johannes, Julia, Kirsten, Lena, Soheil, Stefan und Sylwia, die von Anfang an viel mehr als Kollegen waren. Ihr habt die Arbeit und die gemeinsame Zeit in Marburg zu einem besonderen Erlebnis werden lassen.

Mein größter Dank geht allerdings an meine Eltern, meine Großeltern und meinen Freund Matthias, ohne deren fortwährende Liebe und Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Welche Hydroxycinnamoyltransferasen sind in *Coleus blumei* und in *Glechoma hederacea* nachweisbar und worin besteht der Einfluss von Ozon auf *Melissa officinalis*?“

selbstständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den.....

.....

(Unterschrift mit Vor- und Zuname)

Curriculum vitae

| | |
|----------------------|-------------------|
| Name: | Anne Sarah Döring |
| Geburtsdatum: | 14.01.1983 |
| Geburtsort: | Schleiz |
| Staatsangehörigkeit: | deutsch |
| Familienstand: | ledig |

Bildung:

| | |
|---|---|
| Philipps-Universität Marburg | Juli 2010 – Dezember 2013 Anfertigung der Dissertation am Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie |
| Università di Pisa | März – April 2012/13 Forschungsstipendium des DAAD |
| Johannes-Gutenberg-Universität Mainz | Juni 2010 Approbation |
| Johannes-Gutenberg-Universität Mainz | April 2004 - April 2009 Studium der Pharmazie |
| Carl-Engler Schule Karlsruhe | Oktober 2003 – April 2004 Ausbildung zur PTA |
| Universität Karlsruhe (TH) | Oktober 2002- September 2003 Studium der Chemie (Diplom) |
| Gymnasium Karlsruhe-Neureut | Juli 2002 Abitur |

Berufstätigkeit:

| | |
|---|---|
| Stadt-Apotheke Hallenberg | seit Januar 2011 Nebentätigkeit als Apothekerin |
| Dr. Willmar Schwabe Arzneimittel GmbH & Co. KG Karlsruhe | November 2009 – Mai 2010 Zweiter Abschnitt des Praktischen Jahres |
| Linco-Apotheke Linkenheim | Mai 2009 – Oktober 2009 Erster Abschnitt des Praktischen Jahres |
| Boehringer Ingelheim | September 2008 im Bereich R & D Praktikum (drei Wochen) |
| Life Technologies GmbH Karlsruhe | Juli 1997- Mai 2007 Teilzeitkraft (40 Stunden/ Monat) |